

**Der nikotinische Acetylcholinrezeptor
des Kalbsmuskels als Modell zum
Studium der Myasthenia gravis**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom-Biologe

MICHAEL SCHREIBER

aus Hagen

Bochum, Februar 1988



Das römische Aesthetische Institut
des Kaiserthums als Modell zum
Studium der Mythenologie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Der nikotinische Acetylcholinrezeptor
des Kalbsmuskels als Modell zum
Studium der Myasthenia gravis**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom-Biologe

MICHAEL SCHREIBER

aus Hagen

Bochum, Februar 1988

Diese Arbeit entstand am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Alfred Maelicke.

Ihm besonders möchte ich für die ständige sachkundige Beratung und wohlwollende Förderung dieser Arbeit herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. B. Hess danke ich für seine Unterstützung, ihm sowie Herrn Prof. Dr. G. Boheim außerdem für ihre Bereitschaft, als Gutachter für diese Arbeit tätig zu sein.

Den Mitarbeitern Dr. A. Melms und Dr. S. Krestel der Klinischen Arbeitsgruppe für Multiple Sklerose von Herrn Prof. Dr. H. Wekerle in Würzburg möchte ich recht herzlich für die Beschaffung foetalen Kalbsgewebes danken.

Bei Frau Dr. I. Kalies, Institut und Poliklinik für klinische Immunologie und Rheumatologie der Universität Erlangen-Nürnberg, bedanke ich mich sehr für die Überlassung humanen AchRs, desgleichen bei Herrn Dr. B. Schalke, Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg, für die Überlassung humaner Patientenserum.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Maelicke, Dr. G. Fels, Dr. V. Soskic, M. Müller sowie Frau G. Wehmeier bedanke ich mich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, Anteilnahme und Unterstützung.

1.	Einleitung	1
2.	Die Aufgabenstellung	2
3.	Die Aufgabenstellung	3
4.	Die Aufgabenstellung	4
5.	Die Aufgabenstellung	5
6.	Die Aufgabenstellung	6
7.	Die Aufgabenstellung	7
8.	Die Aufgabenstellung	8
9.	Die Aufgabenstellung	9
10.	Die Aufgabenstellung	10
11.	Die Aufgabenstellung	11
12.	Die Aufgabenstellung	12
13.	Die Aufgabenstellung	13
14.	Die Aufgabenstellung	14
15.	Die Aufgabenstellung	15
16.	Die Aufgabenstellung	16
17.	Die Aufgabenstellung	17
18.	Die Aufgabenstellung	18
19.	Die Aufgabenstellung	19
20.	Die Aufgabenstellung	20
21.	Die Aufgabenstellung	21
22.	Die Aufgabenstellung	22
23.	Die Aufgabenstellung	23
24.	Die Aufgabenstellung	24
25.	Die Aufgabenstellung	25
26.	Die Aufgabenstellung	26
27.	Die Aufgabenstellung	27
28.	Die Aufgabenstellung	28
29.	Die Aufgabenstellung	29
30.	Die Aufgabenstellung	30
31.	Die Aufgabenstellung	31
32.	Die Aufgabenstellung	32
33.	Die Aufgabenstellung	33
34.	Die Aufgabenstellung	34
35.	Die Aufgabenstellung	35
36.	Die Aufgabenstellung	36
37.	Die Aufgabenstellung	37
38.	Die Aufgabenstellung	38
39.	Die Aufgabenstellung	39
40.	Die Aufgabenstellung	40
41.	Die Aufgabenstellung	41
42.	Die Aufgabenstellung	42
43.	Die Aufgabenstellung	43
44.	Die Aufgabenstellung	44
45.	Die Aufgabenstellung	45
46.	Die Aufgabenstellung	46
47.	Die Aufgabenstellung	47
48.	Die Aufgabenstellung	48
49.	Die Aufgabenstellung	49
50.	Die Aufgabenstellung	50
51.	Die Aufgabenstellung	51
52.	Die Aufgabenstellung	52
53.	Die Aufgabenstellung	53
54.	Die Aufgabenstellung	54
55.	Die Aufgabenstellung	55
56.	Die Aufgabenstellung	56
57.	Die Aufgabenstellung	57
58.	Die Aufgabenstellung	58
59.	Die Aufgabenstellung	59
60.	Die Aufgabenstellung	60
61.	Die Aufgabenstellung	61
62.	Die Aufgabenstellung	62
63.	Die Aufgabenstellung	63
64.	Die Aufgabenstellung	64
65.	Die Aufgabenstellung	65
66.	Die Aufgabenstellung	66
67.	Die Aufgabenstellung	67
68.	Die Aufgabenstellung	68
69.	Die Aufgabenstellung	69
70.	Die Aufgabenstellung	70
71.	Die Aufgabenstellung	71
72.	Die Aufgabenstellung	72
73.	Die Aufgabenstellung	73
74.	Die Aufgabenstellung	74
75.	Die Aufgabenstellung	75
76.	Die Aufgabenstellung	76
77.	Die Aufgabenstellung	77
78.	Die Aufgabenstellung	78
79.	Die Aufgabenstellung	79
80.	Die Aufgabenstellung	80
81.	Die Aufgabenstellung	81
82.	Die Aufgabenstellung	82
83.	Die Aufgabenstellung	83
84.	Die Aufgabenstellung	84
85.	Die Aufgabenstellung	85
86.	Die Aufgabenstellung	86
87.	Die Aufgabenstellung	87
88.	Die Aufgabenstellung	88
89.	Die Aufgabenstellung	89
90.	Die Aufgabenstellung	90
91.	Die Aufgabenstellung	91
92.	Die Aufgabenstellung	92
93.	Die Aufgabenstellung	93
94.	Die Aufgabenstellung	94
95.	Die Aufgabenstellung	95
96.	Die Aufgabenstellung	96
97.	Die Aufgabenstellung	97
98.	Die Aufgabenstellung	98
99.	Die Aufgabenstellung	99
100.	Die Aufgabenstellung	100

Für Monika

I.	<u>Inhaltsangabe</u>	
1.	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit	13
2.	Materialien	15
2.1	Radioaktive Substanzen	15
2.2	Weitere Materialien	15
2.2.1	Säulenmaterialien	16
2.3	Versuchstiere	16
3.	Methodischer Teil	17
3.1	Herstellung von α -Toxin-Affinitätssäulen	17
3.2	Isolierung von Acetylcholinrezeptor aus foetalen Kälbern	19
3.3	Bindungstests	21
3.3.1	Membrangebundener AchR - Zentrifugationsbindungstest	21
3.3.2	Gelöster Rezeptor - DEAE-Filtrationstest	22
3.3.3	Immunologischer Toxinbindungstest mit solubilisiertem KACHR	23
3.3.4	Immunologischer Toxinbindungstest mit solubilisiertem humanem AchR	25
3.4	Radioimmunoassay - RIA	26
3.4.1	Nachweis von anti-KACHR-Antikörpern in EAMG induzierten Kaninchen	26
3.4.2	Nachweis von anti-Rezeptor-Antikörpern bei Myasthenia gravis Patienten	27
3.5	Elektrophoretische Methoden	28
3.5.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	28
3.5.2	Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-papier - "Western-Blot"	29
3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	30

3.7	Erzeugung von Antikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren aus foetalem Kalbsmuskel	31
3.7.1	Immunisierung von Kaninchen	31
3.7.2	Herstellung von Kaninchenplasma	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Isolierung des Acetylcholinrezeptors aus foetalem Kalbsmuskel	32
4.1.1	Immobilisierung von α -Neurotoxinen zum Zwecke der Affinitätschromatographie	32
4.1.2	Der membrangebundene Rezeptor	35
4.1.3	Solubilisierung des membrangebundenen Kalbsacetylcholinrezeptors	37
4.1.4	Der solubilisierter K _{AChR}	38
4.1.4.1	Quantifizierung der K _{AChR} -Konzentration des Solubilisats	41
4.1.5	Reinigung des solubilisierten foetalen Kalbsacetylcholinrezeptors durch Affinitätschromatographie	46
4.1.6	Der gereinigte K _{AChR}	48
4.1.7	Zusammenfassung der Solubilisierung und der Reinigung des K _{AChRs}	48
4.2	Wechselwirkung von α -Bungarotoxin und cholinergen Liganden mit dem gereinigten K _{AChR}	50
4.2.1	Kinetik der Assoziation und Dissoziation von α -BTX an den gereinigten K _{AChR}	55
4.2.1.1	Bestimmung der Anlagerungsgeschwindigkeit (k_{+1}) des $^{125}\text{J}-\alpha$ -BTXs an den gereinigten K _{AChR}	55
4.2.1.2	Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante	57
4.2.2	Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem gereinigten K _{AChR} und $^{125}\text{J}-\alpha$ -BTX	59
4.2.3	Wechselwirkung des solubilisierten gereinigten K _{AChRs} mit anderen cholinergen Liganden	65

4.3	Experimentelle und autoimmune Myasthenia gravis	68
4.3.1	Induktion der EAMG in Kaninchen mit Säugetier-AchR	68
4.3.2	Bindungsstudien mit menschlichem AchR	75
4.3.3	Kreuzreaktivität von Humanseren mit Acetylcholinrezeptoren verschiedener Spezies	78
4.3.3.1	Bestimmung des anti-AchR-Antikörpertiters myasthenischer Patientenseren mit $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ komplexiertem KAChR	81
4.3.3.2	Kreuzreaktivität verschiedener anti-AchR-Antiseren mit solubilisiertem humanem AchR- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ -Komplex	85
5.	Diskussion	88
6.	Zusammenfassung	99
7.	Literaturverzeichnis	101

Lebenslauf

Publikationsliste



II. Abkürzungen

α -BTX	<u>alpha-Bungarotoxin</u>
α -CTX	<u>alpha-Cobratoxin</u>
λ_{nm}	Absorption bei den angegebenen Wellenlängen (in nm)
Ach	<u>Acetylcholin</u>
AchR	<u>Acetylcholinrezeptor</u>
Ag	<u>Antigen</u>
Ak	<u>Antikörper</u>
AP	<u>Alkalische Phosphatase</u>
BCIP	(5-bromo-4-chloro-3 indolyl-phosphat)
BSA	Serumalbumin vom Rind (<u>Bovine Serum Albumin</u>)
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (<u>Complete Freund's Adjuvans</u>)
Cl (mCi, Ci)	Curie (entspricht $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm)
D	<u>Dalton</u>
DEAE	<u>Diethylaminoethyl</u>
DMF	<u>Dimethylformamid</u>
dpm	radioaktive Zerfallsereignisse pro Minute (<u>decays per minute</u>)
EAMG	<u>Experimentelle Autoimmune Myasthenia Gravis</u>
EDTA	Natriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym gekoppelter Immuno Assay (<u>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</u>)
g	a) Erdgravitation ($9,81 \text{ m/sec}^2$) b) Gramm
h	Stunden
HAP	<u>Hydroxylapatit</u>
HS	Pferdeserum (<u>Horse Serum</u>)
IAA	Jodoacetamid
IEP	<u>Isoelektrischer Punkt</u>
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans (<u>Incomplete Freund's Adjuvans</u>)

Ig G	Immunoglobulin der Klasse G
IPP	Immunopräzipitin
KAchR	Acetylcholinrezeptor des foetalen Kalbes
mAk	monoklonale Antikörper
MG	Myasthenia gravis
min	Minuten
MIR	Hauptimmunogene Region (Main Immunogenic Region)
M _r	relative Molekülmasse
nAchR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulphate)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren hat folgende Zuordnung:

D Asparaginsäure	G Glycin	Y Tyrosin
N Asparaginn	A Alanin	F Phenylalanin
T Threonin	V Valin	W Tryptophan
S Serin	C Cystein	K Lysin
E Glutaminsäure	M Methionin	H Histidin
Q Glutamin	I Isoleucin	R Arginin
P Prolin	L Leucin	

1. Einleitung

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine seltene Muskelerkrankung (0,03‰ - 0,05‰ der Bevölkerung; (1,2,3,4)), die erstmals im Jahre 1672 von Thomas Willis beschrieben wurde (5). Ihre Symptome äußern sich in Lähmungserscheinungen der quergestreiften Muskulatur, insbesondere der Extremitäten, die bei fortwährender Belastung zur raschen Ermüdung myasthenischer Patienten führen.

Daß ein Defekt der neuromuskulären Reizübertragung im Bereich der motorischen Endplatte zu lokalisieren ist (vgl. Abb. 1) und daß dieser für die Myasthenia gravis und deren induzierbare Form, die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) verantwortlich ist, wurde von Mary Walker (6) und von Patrick & Lindstrom (7) gezeigt.

Walker (6) konnte zeigen, daß die intravenöse Injektion von Physostigmin, bzw. Edrophoniumchlorid (=TENSILON), bei der die im synaptischen Spalt befindliche Acetylcholinesterase reversibel inhibiert wird, bei myasthenischen Patienten eine kurzfristige symptomfreie Periode einleitet. Dieser sog. Tensilontest dient heute als diagnostischer Nachweis der Myasthenia gravis.

Patrick & Lindstrom gelang es, die Ursachen der die EAMG und die MG hervorrufenden Symptome noch genauer einzugrenzen, indem sie die Beteiligung des Acetylcholinrezeptors nachweisen konnten. Sie injizierten Kaninchen gereinigten nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) des Zitterals (Electrophorus electricus) und konnten dadurch in den Versuchstieren Symptome induzieren, die denen myasthenischer Patienten sehr ähnelten und die durch intravenöse Injektion von Tensilon ebenfalls kurzfristig verschwanden (7). Diese Versuche beweisen auch, daß es sich bei der MG um eine Immunkrankheit handelt. Seither gilt die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis als das beste Modell einer

induzierbaren Autoimmunerkrankung. Sowohl bei der EAMG verschiedener Spezies (Kaninchen (7,8,9), Ratten (10,11), Mäuse (12-16), Affen (17)) als auch bei der MG des Menschen (18-20) lassen sich im Serum Antikörper (Ak) nachweisen, die gegen Acetylcholinrezeptoren gerichtet sind.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der neuromuskulären Endplatte zeigen (21-23), daß sowohl bei Myasthenikern als auch bei EAMG induzierten Versuchstieren die typische Faltung der postsynaptischen Membran degeneriert ist und mit dem Verlust funktionsfähiger Acetylcholinrezeptoren einhergeht (23). Dadurch kann das chemische Signal (Binden von Acetylcholin) nicht mehr in eine elektrische Reizantwort (depolarisierendes Membranpotential) umgewandelt werden; die Muskelkontraktion bleibt aus, was im Erscheinungsbild zu den typischen Symptomen der Myasthenia gravis führt.

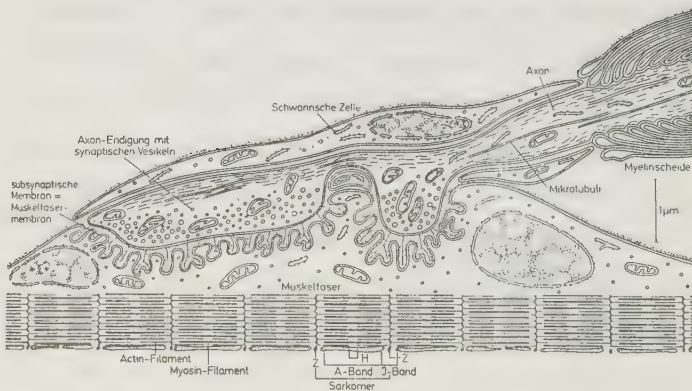


Abb. 1: Feinbau der motorischen Endplatte (aus 24)

Bei der MG wie bei der EAMG handelt es sich um ein komplexes, bis heute unverstandenes Wirkungsgefüge, bei der eine Vielzahl von Parametern, im wesentlichen humoraler und zellulärer Immunantwort, sich gegenseitig beeinflussen, wobei schließlich die Immuntoleranz durchbrochen wird und die Unterscheidungsfähigkeit zwischen Fremd und Selbst verloren geht, was die Zerstörung des AchRs und die damit auftretenden Symptome zur Folge hat. Auf diesem Hintergrund soll die Myasthenia gravis im folgenden ausführlicher beschrieben werden, um diese Autoimmunerkrankung, deren Therapie und die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Experimente besser zu verdeutlichen.

Beteiligung des Immunsystems bei der MG und der EAMG

Daß die Myasthenia gravis ebenso wie der Diabetes mellitus und das Lambert-Eaton myasthenische Syndrom (LEMS (25)) den Autoimmunerkrankungen zuzurechnen ist (22,26), wurde erkannt, als man feststellte, daß sowohl bei Myasthenikern als auch in Versuchstieren Antikörper nachweisbar sind, die mit dem körpereigenen AchR (18,20,27,28,29) und mit heterologem Fisch-AchR reagieren (7,29,30).

Werden monoklonale anti-Rezeptor-Ak (31,32) oder das Serum eines Myasthenikers (33,34) oder eines myasthenischen Tieres (10,11) im Passivtransferexperiment bestimmten anderen Tieren injiziert, so sind auch in diesen die typischen myasthenischen Symptome induzierbar (11,33,34). Weitere Hinweise darauf, daß es sich bei der Myasthenia gravis um eine Schädigung des Immunsystems handelt, stammen aus in vivo und in vitro Versuchen von T-B-Zelltransferexperimenten (5,35-39) und dem Befund, daß Myastheniker, verglichen mit Kontrollgruppen, einen auffällig hohen Prozentsatz (ca. 10 - 40%) Thymome, Tumore der Thymusdrüse, entwickeln (3,40,41,42). Von der Thymusdrüse ist gesichert

(43,44), daß sie die nach ihr benannten T-Lymphozyten prägt, die ihrerseits eine zentrale Rolle in der Makrophagen-T-Zell- und der T-B-Zellinteraktion übernehmen und zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und des Immungleichgewichts entscheidend beitragen. Eine Störung des Immungleichgewichts, wie sie z.B. durch die Entstehung eines Thymoms eintreten kann, ist nur eine von vielen Möglichkeiten, die Immuntoleranz zu durchbrechen.

Wird bei einem Myastheniker mit Thymom dieses durch Thymektomie operativ entfernt (42), so verschwinden auch in den meisten Fällen die typischen myasthenischen Symptome. Diese können nach Monaten oder Jahren aber wieder erneut auftreten (42,45), wobei ihre Ursache sowohl in einer unzureichenden Immuntoleranz als auch in einer Autosensibilisierung liegen könnte (41). Dieser Prozeß der Autosensibilisierung tritt auch bei Gesunden auf und findet in dem für die Immunregulation zentralen Organ, der Thymusdrüse, statt. Dies läßt sich wenigstens aus Beobachtungen entnehmen, nach denen muskelzellähnliche Zellen im Thymus gefunden werden (46-49) und Thymuszellen von Mäusen ein Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, welches mit anti-AchR-Antiseren kreuzreagiert (50), und wonach in 10% der Seren von Myasthenikern mit einem Thymom Antikörper nachweisbar sind, welche sowohl gegen Antigene der quergestreiften Muskulatur als auch gegen Antigene der Thymusdrüse gerichtet sind (51). Im Zusammenhang betrachtet, scheinen diese Phänomene für die Autosensibilisierung der Lymphozyten und die pathologischen Veränderungen, die zur Myasthenie führen, verantwortlich zu sein (46).

Bei der MG kann von einer zentralen Beteiligung der Thymusdrüse und der T-Zellen auch deshalb ausgegangen werden, weil dies durch die in-vitro-Experimente an menschlichen T-Zellen (52-54) und durch die in-vitro-

und die in-vivo-Experimente in Ratten und Mäusen bestätigt werden konnte (5,36,37,39,55).

Die Myasthenia gravis bzw. die EAMG wird außer durch den Immunstatus auch genetisch determiniert (4,56-58) und ist vom Geschlecht, vom Alter und von der ethnischen Gruppe abhängig (3,40). Frauen erkranken an der Myasthenia gravis in jüngeren Jahren (20 - 40 Jahre) häufiger als Männer, während sich dieses Verhältnis später zu Ungunsten der Männer verschiebt (50 - 70 Jahre). Bei Kaukasiern ist die Myasthenie bei der jüngeren Generation häufig mit den Histokompatibilitätsantigenen HLA-B8 und HLA-DRw3 und bei der älteren Generation mit HLA-A2 und HLA-A3 korreliert (3,40,53), während bei Japanern die Myasthenie fast gar nicht mit HLA-A8, aber dafür zusammen mit dem HLA-B12 Histokompatibilitätsantigen auftritt (4); bei Chinesen tritt die Myasthenie hauptsächlich mit dem HLA-DR4 Antigen gekoppelt auf (57).

Diese genetisch im MHC-Bereich (Major Histocompatibility Complex) und dem HLA-Lokus (Human Leucocyte Antigen) determinierten Unterschiede führen nicht nur beim Menschen zu unterschiedlichen Ausprägungsformen der Myasthenie, sondern werden ebenso in Mäusen genetisch durch den H2-Komplex, dem HLA-Komplex des Menschen äquivalent, determiniert. Hier lassen sich eindeutige Unterschiede der Immunantwort verschiedener Mäusestämme feststellen (12,13,15), die bei der induzierten EAMG deutlich zutage treten. Diese Unterschiede sind bei einzelnen Mäusestämmen so stark ausgeprägt, daß sog. "high-, intermediate- und low-responder" Mäuse unterscheidbar sind (16) und die anti-AchR Immunantwort dem unter H-2 gekoppelten Ir-Gen kontrollierten H-2-b Haplotyp zugeschrieben werden kann (14,16). Die Befunde einer bei der Myasthenie genetisch determinierten T-Zell-abhängigen Immunantwort wurden für Mäuse und Ratten (14,15,16,59) durch die Arbeiten von

Christadoss et al. (14,16) und Atassi et al. (60) und für den Menschen durch die Arbeiten von Hohlfeld & Toyka et al. bewiesen (53,55).

Gemeinsames Ziel all dieser Untersuchungen ist es, einen Zugang zu Therapieformen der Myasthenie zu entwickeln, die neben der symptomatischen Behandlung die Ursache(n) der MG zu ergründen und diese auszuschalten versuchen. Sowohl bei der symptomatischen wie auch der ätiologischen Therapie bemüht man sich, derart in das Immunsystem einzugreifen, daß entweder auf humoraler oder zellulärer Ebene das Gleichgewicht der Immuntoleranz, d.h. die Fähigkeit zur Erkennung von Fremd und Selbst, wieder hergestellt wird. Um die anti-Rezeptorantikörperkonzentration des Serums myasthenischer Patienten auf ein normales Niveau abzusenken, werden derzeit zwei Therapieformen angewendet: die unspezifische Immunsuppression oder die nur gegen das Antigen gerichtete selektive Immunsuppression. Erstere wird bereits beim Menschen praktiziert, während letztere noch am Tier verifiziert werden muß.

Die unspezifische Immunsuppression

Die unspezifische Immunsuppression umfaßt bei der Myasthenie des Menschen im wesentlichen drei Behandlungsformen: erstens die bereits erwähnte Thymektomie (41,42), zweitens die medikamentöse Behandlung mit Immunsuppressiva (entspricht in ihrer Vorgehensweise der selten praktizierten Ganzkörperbestrahlung (61)), und drittens die Plasmapherese.

Die Verwendung von Immunsuppressiva, Corticosteroiden (Prednisolon, Dexamethason), Antimetaboliten (Azothioprin = Imurec) und Zytostatika (Cyclosporin A) beruht im wesentlichen auf Befunden, die der Transplantationschirurgie entstammen, bei der Immunsuppressiva zur Verhinderung der Transplantatabstoßung verabreicht werden. Trotz der

noch ungeklärten Mechanismen, die die Immunsuppression auslösen, werden Corticosteroide, Azothioprin, Cyclosporin und Cyclophosphamid auch zur Behandlung der Myasthenia gravis verwendet. Dabei hofft man, vorzugsweise sich rasch proliferierende Zellen, also auch die Helfer/Suppressor T-Zellen und die B-Zellen des Immunsystems, zu beeinflussen. Durch die tägliche Gabe hoher Dosen (100 - 300 mg Mengen (22,45,62)) dieser Immunsuppressiva ist nach Monaten medikamentöser Behandlung (2 - 6 Monate) eine Verminderung des Serumantikörperspiegels zu beobachten, von der auch die Konzentration der anti AchR-Ak betroffen ist (45). Mit der Immunsuppression ist im Menschen ein Verlust der T-Helfer- (OKT4-Oberflächenmarker) und der T-Suppressor Zellen (OKT8-Oberflächenmarker) (63) sowie ein Verlust der die Antikörper produzierenden B-Zellen verbunden. Die humorale Immunantwort wird also über die unspezifische Suppression der an der Immunantwort beteiligten T- und B-Lymphozyten gehemmt. Dadurch werden die an dem Abbau und der Zerstörung der neuromuskulären Endplatte beteiligten anti-AchR-Ak aus dem Blutkreislauf und dem Lymphsystem "entfernt". Bei dieser Behandlung tritt in ca. 70 - 80% der Fälle eine Remission der MG auf (45,64); in etwa 20 - 40% der Fälle treten die mit der Immunsuppression verbundenen Nebenwirkungen auf (62,64). Diese reichen über Verhaltensstörungen, Kaliummangel und Gewichtszunahme (Cushing-Syndrom) bis hin zu Herzschädigungen, Trübungen der Augenlinse und der Induktion weiterer autoimmunologischer Erkrankungen (Diabetes mellitus) (62,63,65-67). Es ist zu berücksichtigen, daß die drastische und lang andauernde Immunsuppression zu einer permanenten Schwächung des Immunsystems führt, so daß die Patienten wesentlich anfälliger gegenüber sonst vergleichsweise harmlosen Infektionskrankheiten sind.

Wie bei der immunsuppressiven Behandlung mit Medikamenten ist auch bei der Plasmapherese das Ziel, die Konzentration der im Kreislauf zirkulierenden anti-AchR-Ak zu reduzieren, um so die AK-abhängige Degradation des AchRs in der neuromuskulären Endplatte zu inhibieren. Dies wird dann erreicht, wenn ca. 70 - 90% (68) der anti-AchR-Ak aus dem Blut filtriert werden. Der Erfolg der Plasmapherese ist im Gegensatz zur Immunsuppression nur von kurzer Dauer. Die Plasmapherese muß daher kontinuierlich durchgeführt werden und erfolgt dort, wo eine rasche Behandlung erforderlich ist, bzw. die immunsuppressive Behandlung keinen Erfolg zeigt (69).

Die selektive Immunsuppression

Bislang werden folgende Wege der selektiven Immunsuppression in Tier- und in in-vitro-Experimenten beschritten, wobei zwischen einer direkten und einer indirekten selektiven Immunsuppression zu unterscheiden ist.

1. Die selektive Immunsuppression versucht die Ak-produzierenden B-Zellen bzw. die sie unterstützenden T-Helfer Zellen durch Antigen-Toxinkonjugate (70) oder Immunotoxinkonjugate, sog. "magic bullets" (71,72) zu zerstören.

2. Die indirekte selektive Immunsuppression versucht gemäß Jernes Netzwerktheorie idiotypischer und antiidiotypischer Antikörper (73,74) in den Regelkreis der Immunregulation einzugreifen. Dabei ist die Spezifität der anti-idiotypischen Antikörper entscheidend an die Fragen geknüpft:

a) sind es anti-idiotypische Ak (anti-id-Ak), die direkt aus der Immunisierung mit dem AchR abgeleitet wurden (9,74,75,76), oder sind es, wie im Falle der von Erlanger hergestellten anti-BisQ-Antikörper (77,78),

Antikörper, die indirekt gegen den AchR hergestellt wurden und auch gegen den AchR gerichtet sind (79,80)?

b) sind es anti-Idiotypische Ak, die, wie in 1., gegen Idiotypische Determinanten der T- und B-Zellen gerichtet sind (9,81)?

Eine Sonderstellung nehmen solche Antikörper ein, die entweder gegen die T-Zellen oder gegen Makrophagenoberflächenantigene, I-A-Antigene, gerichtet sind, die sowohl bei der Antigenpräsentation durch Makrophagen als auch bei der Makrophagen-T-Zell Interaktion beteiligt sind. Diese anti-I-A-Antikörper (82) bzw. die anti-T-Helferzell Antikörper (14) können aber selektiv die anti-AchR-Ak Antwort supprimieren, indem entweder die T-Helferzellen ausgeschaltet oder die Zellkooperation zwischen Makrophagen und T-Zellen unterbunden wird.

Die Möglichkeit, den AchR so zu modifizieren, daß der Rezeptor seine EAMG induzierenden Eigenschaften verliert und als Impfstoff zur Immunprophylaxe verwendet werden könnte, wurde in Tierexperimenten gezeigt, war aber nicht, wie bei der üblichen Aktivimmunisierung, zur Langzeittherapie geeignet (9,83,84).

Grundlage für die EAMG

Daß die EAMG in Säugern mit nikotinischem Fisch-AchR induziert werden kann, ist in der Sequenzhomologie der AchRs begründet (85).

Bislang wurde nur in seltenen Fällen (10,86), bedingt durch die geringen Rezeptorausbeuten und den damit verbundenen Arbeitsaufwand, nikotinscher Säugetier-AchR zur Induktion der EAMG verwendet. Ebenso wird gewöhnlich Fisch-AchR zum Studium der Lymphozytenkooperation (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen) verwendet (5,36,37,52,53,87,88).

Die mit dem Fisch-AchR erzielten Ergebnisse der EAMG und der in-vitro Zellexperimente werden zur Erklärung der die Autoimmunerkrankung auslösenden Prozesse der MG herangezogen. Bei der EAMG wie bei der MG ist der AchR zwar das Zielantigen, jedoch ist dessen Rolle als sensibilisierendes Autoantigen bei der Myasthenia gravis noch nicht gesichert (3,21,40,89). Hierin liegt die Bedeutung des in dieser Arbeit vorgestellten Tiermodells, der Induktion der EAMG in einem Säugetier mit einem Säuger-AchR.

Wie bereits erwähnt, laufen vermutlich bei der EAMG und der MG des Menschen vergleichbare zelluläre Prozesse ab (52,54,90). So konnte Tzartos et al. (91-94) in Konkurrenzexperimenten mit monoklonalen anti-Torpedo-AchR- Antikörpern zeigen, daß sowohl in 50 - 70% der Seren EAMG induzierter Ratten als auch in Seren myasthenischer Patienten Antikörper vorhanden sind, die gegen die sog. hauptimmunogene Region - den MIR-Bereich (MIR = Main Immunogenic Region), gerichtet sind. Die MIR ist auf der α -Untereinheit des Acetylcholinrezeptors lokalisiert (60,91,95-98) und kommt mit den beiden α -Rezeptoruntereinheiten zweimal pro AchR-Monomer vor.

Bei der EAMG und der MG kann von einer Beteiligung der anti-MIR-Ak und anti-AchR-Antikörpern auch deshalb ausgegangen werden, da gezeigt werden konnte, daß diese Antikörper in dem sogenannten Prozeß der Antigenmodulation die AchRs der neuromuskulären Endplatte quervernetzen. Diese Quervernetzung führt in der neuromuskulären Endplatte zu einem beschleunigten AchR-Abbau und wird von einer Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen begleitet (21,94,99), die ihrerseits diesen autokatalytischen Abbauprozess unterstützen. Bei Mäusen, deren Komplementsystem zerstört bzw. entzogen wurde, ist dieser Prozeß weniger

ausgeprägt, so daß auch eine Beteiligung des Komplementsystems bei EAMG wie bei MG nicht ausgeschlossen werden kann (34).

Kreuzreaktivität von anti-AchR-Antikörpern

Daß zwischen den AchRs verschiedener Tierspezies eine phylogenetische Verwandtschaft besteht, läßt sich sowohl durch die Aminosäuresequenzhomologie (85,100-119; vgl. Tabelle 1), als auch durch die Kreuzreaktivität (30 - 90%, je nach Art des verwendeten AchRs und der Testbedingungen) der anti-AchR-Antiseren zeigen (30,40,120-124).

Tabelle 1: Sequenzhomologie der Acetylcholinrezeptoruntereinheiten verschiedener Spezies (entnommen aus (85))

	Human α	Calf α	Torpedo α	Calf β	Torpedo β	Human γ	Calf γ	Torpedo γ	Calf δ	Torpedo δ
Human α	97	79	37	40	33	32	35	34	34	
Calf α	97	79	37	39	33	32	35	35	34	
Torpedo α	80	81	35	40	32	31	34	36	34	
Calf β	38	38	37	58	41	39	41	40	39	
Torpedo β	41	40	42	59	40	40	41	41	40	
Human γ	33	33	33	41	41	92	55	46	43	
Calf γ	32	33	32	40	41	92	55	47	45	
Torpedo γ	35	35	35	41	41	55	56	48	49	
Calf δ	35	36	37	41	42	46	48	48	58	
Torpedo δ	34	34	35	40	41	44	46	50	60	

Wird statt des humanen AchR derjenige des elektrischen Organs des Zitterrochen als Antigen verwendet, so binden von 90% myasthenischer Patientenserum, die mit humanem AchR reagieren, etwa 70% mit dem Fisch-AchR (27,125). Diese Kreuzreaktivität kommt durch die Ähnlichkeit der MIR von Mensch- und Torpedo-AchR zustande. Auf dem Niveau

monospezifischer Antikörper ist die Kreuzreaktivität zwischen Säugetier- und Fisch-AchR wesentlich geringer (93,126). Tests zum Nachweis von anti-AchR-Antikörpern in Patientenseren sind daher umso spezifischer, je näher der verwendete AchR dem menschlichen AchR steht. Allerdings sind die Beschaffung von Säugetiergewebematerial, die Solubilisierung und Reinigung des AchRs bisher noch mit großen Schwierigkeiten verbunden.

Menschliches Muskelgewebe ist nur schwer zugänglich. Es wird in der Regel von Beinen präpariert, welche aufgrund von Diabetes in Zusammenhang mit peripheren Durchblutungsstörungen und Geschwürbildung (diabetisches Gangrän) amputiert wurden (28,125-128). Die Verwendung von gesundem (18) oder gar foetalem menschlichen Muskelgewebe (127) ist nicht allgemein und in ausreichenden Mengen möglich. Außer der Beschaffung menschlichen Muskelgewebes ist auch die Extraktion des Muskel-AchRs problematisch. So ist die Konzentration nikotinischer AchRs in Säugermuskelgewebe 1.000 - 10.000fach niedriger (129,130) als in den elektrischen Organen von Zitteraal und Zitterrochen (21). Außerdem beeinträchtigt die hohe Proteaseaktivität des Muskels (36,131) die Ausbeuten an solubilisiertem Säuger-AchR.

Abhilfe könnte hier der molekularbiologische Ansatz bieten (96,98). Von den Rezeptoruntereinheiten der Maus sind die α -, β - und δ - Untereinheit (100-103), vom Mensch die α - und γ - Untereinheit (104,105) und vom *Torpedo marmorata* AchR die α - Untereinheit (106) kloniert; vollständig, d.h. mit den Rezeptoruntereinheiten: α -, β -, γ -, δ -, ist der *Torpedo californica* AchR (107,108,110,111) und auch die foetale und adulte Form des Kalbs-AchRs kloniert (85,112-114). Obwohl rekombinante Kalb- und *Torpedo*-mRNA schon in Oocyten des Frosches *Xenopus laevis* (115) exprimiert und für funktionelle elektrophysiologische und biochemische Studien zugänglich ist (116-119), ist es bis vor kurzem (132) noch nicht

möglich gewesen, permanente Zelllinien zu etablieren, welche die Gene des AchRs in funktioneller Form, d.h. auch richtig glykosiliert, exprimieren (133).

Um den AchR biochemisch zu charakterisieren und die Seren myasthenischer Patienten testen zu können, ist man daher zur Zeit noch auf die biochemische Präparation nikotinischer Säuger-AchR angewiesen.

1.1 Ziel der Arbeit

Während die nikotinischen AchRs des Zitteraals und des Zitterrochens den am besten charakterisierten Neurorezeptor darstellen (134-138), ist die Reinigung und Charakterisierung nikotinischen AchRs aus foetalem Kalbsgewebe erst kürzlich (86,139) und mit schwankenden Ausbeuten beschrieben worden.

Am vielversprechendsten ist in diesem Zusammenhang die 1982 von Einarson et al. (86) veröffentlichte Methode, derzufolge "annähernd Milligramm Mengen" hochreinen AchRs aus foetalen Kälbern isoliert werden konnten. Diese Publikation war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit, AchR aus foetalem Kalbsgewebe zu isolieren und diesen biochemisch, pharmakologisch und immunchemisch zu charakterisieren. Dabei sollte überprüft werden, ob sich (a) der foetale Kalbs-AchR vom nikotinischen AchR des Zitteraals bzw. Zitterrochens biochemisch und pharmakologisch in seinen Ligandenbindungseigenschaften unterscheidet, und ob (b) die EAMG statt mit einem Fisch-AchR auch mit einem Säugetier-AchR in Säugetieren induzierbar ist. Hierdurch würde der direkte Vergleich zur Myasthenie des Menschen ermöglicht. Schließlich sollte (c) überprüft werden, ob der aus foetalem Kalbsgewebe isolierte nikotinische

Säugetier-AchR als adäquates Antigen zur Charakterisierung myasthenischer Patientenseren verwendet werden kann.

Um diese Ziele zu erreichen, sollten die in der Literatur beschriebenen Solubilisierungs- und Reinigungsmethoden für den Kalbs-AchR wiederholt und gegebenenfalls verbessert werden; der Kalbs-AchR sollte erstmals biochemisch charakterisiert werden, und es sollten Antikörper gegen diesen AchR produziert werden. Für die immunologische Charakterisierung des Rezeptors sowie für seine Verwendung als Testantigen für Patientenseren kam es insbesondere auf hohe Ausbeuten und ausreichende Reinheit der Rezeptorpräparationen an. Dieser Teil des Projekts wurde deshalb besonders gründlich betrieben, insbesondere als klar wurde, daß die in der Literatur beschriebenen Methoden nicht die gewünschte Reinheit und Ausbeuten lieferten. Die grundsätzlichen Grenzen in Menge und Reinheit des isolierten Kalbmuskelrezeptors haben sich insofern auf die Charakterisierung des Rezeptors ausgewirkt, als die Beschaffung des Gewebes und die Reinigung des für die Experimente notwendigen KAChRs stets mit sehr hohem zeitlichen Aufwand verbunden war. Hierin liegt auch der Grund dafür, daß die in der Literatur beschriebene Reinigung bisher nicht zu einer gründlichen Charakterisierung des Kalbs-AchRs geführt haben. Dennoch konnte der KAChR begrenzt charakterisiert werden, erlaubte die Induktion der EAMG und ermöglichte, Patientenseren auf diesem Rezeptor zu testen.

2. Materialien

2.1 Radioaktive Substanzen

(¹⁴ C)-markierte Standardproteine (40 Ci/mmol)	Amersham
(¹²⁵ I)-Bungarotoxin (240 Ci/mmol)	Amersham

Die spezifischen Aktivitäten sind Angaben des Herstellers. Zur Umrechnung - es gilt: 1 mCi = 37 Mbq (Bequerel).

2.2 Weitere Materialien

α-Bungarotoxin	Sigma
Naja, naja siamensis (Schlangengift)	Miami Serpentarium, Florida
Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin	Calbiochem
Anti-Kaninchen-IgG-AP-markiert	Serva (Promega)
Anti-Maus-IgG	Calbiochem
Aprotinin (Trasylo1)	Bayer AG
BCIP	Sigma
Benzamidin	Sigma
Benzoquinonium Chlorid; ein Geschenk der Firma	Stirling Winthrop Inc.
BSA	Sigma
Carbamylcholin	Sigma
CFA (Lot Nr. 53 A)	Behring
DEAE-Cellulose-Filter	Whatman
flexible Mikrotiterplatten (Micro Test III)	Falcon
Formaldehyd (35%-ige Lösung)	Merck
Gelatine	Biorad
IFA	Behring

Immunopräzipitin	BRL
NBT	Sigma
Nitrocellulosepapier (BA 85)	Schleicher & Schüll
Pepstatin A	Sigma
SDS	Biorad
Polyoxyethylen-p-t-octylphenol (Triton-X-100)	NEN
Polyoxyethylenglykol-sorbitol-mono-Ölsäure (Tween 80)	Sigma

2.2.1 Säulenmaterialien

Affi-Gel-10	Biorad
Hydroxylapatit (Biogel)	Biorad
Sepharose 4B	Pharmacia

2.3 Versuchstiere

Kaninchen (Rasse: „Weiße Neuseeländer“)	Ivanovas, Kisslegg
---	--------------------

Die Zitterrochen (*Torpedo marmorata*) wurden von der Société Scientifique d' Arcachon, Frankreich, bezogen.

Foetale Kälber wurden über die Schlachthöfe Würzburg und Düsseldorf bezogen. Nach der Schlachtung wurde das foetale Kalbsgewebe mit Stickstoff übergossen und zum Transport bei -80° C gehalten.

Alle Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Serva, Sigma, Pierce, Merck, Baker und Aldrich bezogen. ¹²⁵Jod markierte Proben wurden in einem Gammastrahlungszähler (Automatic Gamma System; Zinsser Analytic Model 1185 R) bei 85% iger Zählausbeute gemessen.

3. Methodischer Teil

3.1 Herstellung von α -Toxin Affinitätssäulen

Zur Affinitätschromatographie foetalen Kalb-Acetylcholinrezeptors (KACHR) wurden drei mit α -Neurotoxinen (α -CTX, α -BTX) gekoppelte Affinitätssäulen (A - C) hergestellt und deren Bindungskapazitäten bestimmt.

250 ml Sepharose 4B wurde mit CNBr nach der Methode von Cuatrecasas (140) (10 g CNBr in 25 ml Acetonitril) bei pH 11 aktiviert, schnell mit 1,5 l eiskalter 0,1 M NaHCO_3 -Lösung zur Entfernung freien CNBRs am Wasserstrahlpumpenvakuum gewaschen und in 0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl pH 8,8 aufgeschwemmt. Gereinigtes α -Cobratoxin (α -CTX), 1,6 μmol , wurde über Nacht bei 4° C unter ständigem Rühren mit einem Rührstab zur Kopplung an die aktivierte Sepharose 4B eingesetzt; danach wurde das α -CTX-Affinitätsadsorbens (Affinitätssäule A) mit je 0,5 l der nachfolgenden Puffer auf einer Glasfritte am Wasserstrahlvakuum gewaschen

0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0;
0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,0;
0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 8,0;
0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0;
0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl pH 7,4

und die noch überschüssigen Gruppen, 2 h bei Raumtemperatur, mit 0,2 M Glycin/HCl pH 8,0 reagiert. Aus der Differenz des zur Kopplung eingesetzten und des nicht gebundenen α -CTXs wurde das Ausmaß der Kopplung (nmol gebundenes α -CTX pro 250 ml Sepharose 4B) bestimmt.

Alternativ ist auch an bereits CNBr präaktivierte Sepharose (Pharmacia) und an N-hydroxysuccinimide-Ester derivatisierte Agarose (Affi-Gel—10;

Bio-Rad) α -Bungarotoxin gekoppelt worden. Dabei wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers verfahren (Bio-Rad, Pharmacia).

375 nmol α -BTX (in 6 ml 0,1 M NaHCO_3) wurde über Nacht bei 4° C mit 5 ml präaktivierter Agarose gerührt und das α -Neurotoxin an die Agarose gekoppelt (Affinitätssäule B).

Unter den gleichen Bedingungen wurde α -BTX zur Kopplung an 3 Gramm präaktivierte Sepharose 4B eingesetzt (Affinitätssäule C). Nach der Kopplung wurden die Affinitätsadsorbentien (Affinitätssäule B, Affinitätssäule C) mit je 0,5 l der nachfolgenden Puffer gewaschen

0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0;
0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,0;
0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 8,0;
0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0;
0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl pH 7,4

und die überschüssig aktivierten Gruppen mit 0,2 M Glycin/HCl pH 8,0 innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Kopplungsraten der Affinitätssäulen B und C wurden unter Verwendung von 10 pmol ^{125}J - α -BTX als Markermolekül bestimmt.

Nach Gebrauch wurden die Affinitätsadsorbentien mit je 1 l 10% Ethanol, 2 l destilliertem Wasser, 1 l 1 M NaCl und abschließend mit 2 l Wasser gewaschen und in 10 mM NaN_3 , 0,02% Chlorhexidin (Fungizid) bei 4° C aufbewahrt.

3.2 Isolierung von Acetylcholinrezeptor aus foetalen Kälbern

Verwendete Puffer:

Puffer	I	10 mM EDTA 100 mM NaCl 10 mM Imidazol 2,2 μ M Aprotinin 1 mM PMSF 10 mM IAA 1 μ g/ml Pepstatin A 10 mM Na_2HPO_4 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer	II	10 mM NaNa 100 mM NaCl 1 mM PMSF 10 mM Na_2HPO_4 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer	III	0,5 % Triton-X-100 10 mM NaNa 100 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer	IV	0,5 % Tween 80 100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
Puffer	V	0,5 % Tween 80 100 mM NaCl 1 mM Benzoquinonium 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
Puffer	VI	0,05 % Tween 80 5 mM Na_2HPO_4 5 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer	VII	0,05 % Tween 80 100 mM Na_2HPO_4 100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4

Die Solubilisierung und Reinigung gelösten foetalen Kalbs-Acetylcholinrezeptors wurde ähnlich der von Einarson et al. (86) publizierten Methode durchgeführt.

Hinterbein- und Keulenmuskulatur von 4 - 6 Monate alten (141) Kalbsfoeten (32 cm - 45 cm) wurde schnell, d.h. ca. 30 - 40 min nach der Schlachtung (Schlachthof Würzburg) entnommen, mit flüssigem Stickstoff übergossen, zum Transport und bis zur Rezeptorreinigung bei - 80° C aufbewahrt.

Entbeintes, tiefgefrorenes foetales Kalbsmuskelgewebe (300 - 500 g) wurde mit Hammer und Meißel zertrümmert und mit 4 Volumina Puffer I in einem 5 Liter Mixer unter Zusatz von Proteaseinhibitoren homogenisiert. Pepstatin A und Phenyl-methyl-sulfonylfluorid (PMSF) wurden als frische ethanolische Stocklösungen erst kurz vor der Homogenisierung dazugegeben. Jodoacetamid und PMSF hydrolisieren schnell (142) und wurden deshalb ebenfalls erst kurz vor der Homogenisierung dazugegeben. Nach dem Homogenisieren (20.000 Upm, 3 * 30 sec mit je 1 min Pause) wurde das Homogenat (Homogenat I) 40 min bei 9000 Upm (16.700 g) in zwei GS3 Rotoren bei 4° C zentrifugiert, das Sediment (Sediment I) in 5 Volumina Puffer II aufgenommen, rehomogenisiert (20.000 Upm, 2 * 30 sec mit je 1 min Pause), erneut bei 16.700 g zentrifugiert (Sediment II) und anschließend in 5 Volumina Puffer II aufgenommen (Homogenat II) und anschließend mit 2 % Triton-X-100 versetzt. Die Suspension (500 - 700 ml) wurde 2 h bei 4° C unter Verwendung eines Rührstabs (KSG Rührer) gerührt und anschließend in einem Ti 19 Rotor 1 h bei 19.000 Upm (53.700 g) in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die unlöslichen von den löslichen Bestandteilen getrennt (Sediment III), der Überstand mit dem solubilisierten K_{ACh}R, durch 4 Lagen Nylonnetz filtrierte und das Filtrat mit der α -Bungarotoxin Sepharose 4B Affinitätssäule schonend unter Verwendung eines Flügelrührstabs 15 h bei 4° C vorsichtig verrührt. Anschließend wurde das Affinitätsadsorbens unter Unterdruck (Wasserstrahlvakuum) auf einer

Glasfritte mit 1 l kaltem Puffer III und 1 l kaltem Puffer IV gewaschen und dabei auch die nicht biospezifisch adsorbierten Proteine von der Säule gewaschen. Der Kalbs-Acetylcholinrezeptor wurde über Nacht bei 4° C biospezifisch mit dem hochaffinen Antagonisten Benzoquinoniumchlorid (1 mM Benzoquinonium, 15 ml Puffer IV) von der α -BTX-Sepharose 4B Affinitätssäule desorbiert. Zur Abtrennung von Benzoquinonium und zur Konzentrierung des Rezeptors wurde das Eluat über Nacht rezirkulierend durch eine nachgeschaltete Hydroxylapatitsäule (143) (HAP-Säule, Bio-Gel HTP; 5 mm * 5 mm) gepumpt (30 - 40 ml/h).

Die HAP-Säule, äquilibriert in Puffer V wurde anschließend mit 50 - 70 ml Puffer VI gewaschen und der K_{AChR} mit 100 mM Na-Phosphatpuffer 0,05% Tween 80, pH 7,4 (Puffer VII) von der HAP-Säule eluiert.

3.3 Bindungstests

3.3.1 Membrangebundener AChR - Zentrifugationsbindungstest

Die Konzentration an Ligandenbindungsstellen des membrangebundenen K_{AChR}s wurde vor und nach der Solubilisierung als Anzahl der Toxinbindungsstellen bestimmt. Hierzu wurde der Bindungstest von Covarrubias et al. (144) verwendet, bei welchem freier und membrangebundener Ligand durch Zentrifugation voneinander getrennt werden. Dadurch wurde a) die Rezeptorkonzentration des Ausgangsmaterials (Sediment II) und b) aus der Differenz der Rezeptorkonzentration in Sediment II (Rezeptorkonzentration des membrangebundenen Rezeptors vor der Solubilisierung) und Sediment III (Rezeptorkonzentration des membrangebundenen Rezeptors nach Solubilisierung) die Menge solubilisierten Rezeptors berechnet.

0,5 ml Homogenat des Homogenats vor bzw. nach Solubilisierung (Sediment II, Sediment III) wurde mit sättigenden Konzentrationen (3 - 9 nM) ¹²⁵J-

α -BTX in 1 ml Puffer (PBS) 24 h bei Raumtemperatur in Eppendorfgefäßen inkubiert und das gebundene von dem freien ^{125}J - α -BTX durch Zentrifugation (1 h, 20.000 Upm, SS-34-Rotor, 4° C) bei 53.700 g voneinander getrennt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abpipettiert und verworfen und die im Sediment gebundene Radioaktivität des ^{125}J - α -BTXs in einem Gammstrahlenzähler gezählt.

Zur Bestimmung der unspezifischen ^{125}J - α -BTX-Bindung wurden die Proben mit 1 μM unmarkiertem α -BTX 15 min bei 20° C inkubiert. Die Menge spezifisch gebundener Radioaktivität ergibt sich aus der Differenz von dem im Pellet gebundenen (in Abwesenheit von unmarkiertem α -BTX) und dem im Pellet unspezifisch gebundenen (in Anwesenheit unmarkierten α -BTXs) ^{125}J markierten α -BTX. Aus der Konzentration spezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTXs wurde die Toxinbindungsstellenzahl und die Konzentration membrangebundenen Rezeptors berechnet.

3.3.2 Gelöster Rezeptor - DEAE-Filtrationstest

PBS	140,0	mM NaCl
	2,7	mM KCl
	6,5	mM Na_2HPO_4
	1,5	mM KH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer II	10	mM NaCl
	10	mM Tris/HCl, pH 7,4

10 bis 20 μl gereinigter KACHR (Eluat der HAP-Säule, durchschnittlich 15 μg Protein/ml) wurde mit steigenden Konzentrationen (30 pM - 3 nM) ^{125}J - α -BTX über Nacht 24 h bei Raumtemperatur (20° C) in 2 ml PBS mit 0,05% Tween 80 inkubiert, nachfolgend innerhalb von 30 sec mit 8 ml Puffer II aufgefüllt, durch zwei übereinanderliegende mit Puffer II angefeuchtete DEAE-81-Cellulose-Filter (Durchmesser 2,4 cm) filtriert und die Filter mit 10 ml Puffer II unter Unterdruck (Wasserstrahlvakuum) gewaschen.

Freies $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ wird von den Filtern nicht festgehalten, der $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX-KAchR-Komplex}$ wird dagegen von den Filtern zurückgehalten. Aufgrund der extrem langsamen Dissoziation des Rezeptor-Toxin-Komplexes (die Halbwertszeit $t_{1/2}$ liegt in der Größenordnung von ca. 70 - 150 Stunden (129,145)) kann der Rezeptor-Toxin-Komplex einfach, schnell und zuverlässig durch den DEAE-Filtrationstest quantifiziert werden.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die Proben mit 150 nM unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$ inkubiert (Vorinkubation mit unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$, 15 min bei 20° C). Aus der Differenz zwischen gebundenem (in Abwesenheit unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$) und unspezifisch gebundenem $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ (Inkubation in Anwesenheit unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$) wurde die Anzahl der Toxinbindungsstellen und die Reinheit des KAChRs (durchschnittlich 1,4 nmol Toxinbindungsstellen/mg Protein) berechnet. Bei einem Molekulargewicht des $\alpha\text{-BTXs}$ und des KAChRs von ca. 8.000 (146) bzw. ca. 290.000 D (85,86,113,114,136,147) sollten theoretisch ca. 7 - 8 nmol Toxin pro mg Rezeptorprotein gebunden werden können.

3.3.3 Immunologischer Toxinbindungstest mit solubilisiertem KAChR

PBS	140,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer II	1 % Triton-X-100 1 % Kaninchennormalserum 100 mM NaCl 20 mM NaN_3 10 mM Na_2HPO_4 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4

0,025 ml solubilisierter KAChR wurde in 0,85 ml PBS Tween-80 0,05%, pH 7,4 mit steigenden Konzentrationen $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ (10 pM - 3 nM) 24 h bei Raumtemperatur in Eppendorfgläsern inkubiert, mit 0,1 ml einer 1:100

Verdünnung (in Puffer II) eines Kaninchen-anti-KAChR-Plasmas 11 h über Nacht bei 4° C inkubiert und anschließend 5 Stunden bei Raumtemperatur mit 0,05 ml eines Ziege-anti-Kaninchen-Gamma-globulin-serums inkubiert. Danach wurde die Probe 6 min bei 10.000 g in einer Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Immunpräzipitat mit dem gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ in einem Gammastrahlenzähler ausgezählt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ wurde mit 250 nM unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$ inkubiert (Vorinkubation mit unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$ 15 min bei 20° C). Aus der Differenz der gebundenen (in Abwesenheit unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$) und unspezifisch gebundenen (in Anwesenheit 250 nM unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$) Radioaktivität der Immunpräzipitate wurde die Konzentration des spezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$, und damit die Zahl der Toxinbindungsstellen pro 0,025 ml Rezeptorlösung berechnet.

Dadurch, daß alle Proben mit 1% Kaninchennormalserum (Serum eines gesunden, unbehandelten Kaninchens der Rasse Weiße Neuseeländer) inkubiert wurden, war das Immunpräzipitat genügend groß, um den Überstand abpipettieren zu können.

3.3.4 Immunologischer Toxinbindungstest mit solubilisiertem humanen AchR

PBS	140,0 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	6,5 mM Na_2HPO_4
	1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

Zur Bestimmung der Rezeptorkonzentration und des scheinbaren K_D -Wertes wurde solubilisierter humaner AchR (0,3 ml) mit steigenden Konzentrationen (10 pM – 6 nM) ^{125}J - α -BTX in einem Reaktionsvolumen von 0,94 ml PBS Tween 80 0,05% in Abwesenheit und in Anwesenheit unmarkierten α -BTXs (500 nM) in Eppendorfgefäßen 19 Stunden bei 20° C inkubiert und 3 h mit 0,01 ml Serum eines myasthenischen Patienten (anti-human-AchR-Ak-Titer: 74 nmol/Liter Serum) inkubiert. Anschließend wurde 3 h Stunden mit 0,05 ml Immunopräzipitin (IPP = formalin fixierte Staphylococcus aureus Zellen; 10%-ige Suspension (w/v)) inkubiert, der Rezeptor-Toxin-Ak-Komplex präzipitiert und das freie von dem im Niederschlag gebundenen ^{125}J - α -BTX durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand verworfen und die im Präzipitat gebundene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler bestimmt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des ^{125}J - α -BTX wurde mit 500 nM unmarkiertem α -BTX inkubiert (Vorinkubation mit unmarkiertem α -BTX 15 min bei 20° C), und aus der Differenz der in den Immunpräzipitaten gebundenen (in Abwesenheit unmarkierten α -BTXs) und unspezifisch gebundenen Radioaktivität (in Anwesenheit unmarkierten α -BTXs) wurde die Konzentration des spezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTXs, und damit die Konzentration des solubilisierten humanen AchRs pro 0,3 ml Rezeptorlösung berechnet.

3.4 Radioimmunoassay - RIA

3.4.1 Nachweis von anti-KAChR-Antikörpern in EAMG induzierten Kaninchen

PBS	140,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
Puffer II	1 % Triton-X-100 1 % Kaninchennormalserum 100 mM NaCl 20 mM Na_2SO_4 10 mM Na_2HPO_4 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4

Um gleichzeitig eine größere Anzahl verschiedener Kaninchen-anti-Kalb-AChR Plasmen unterschiedlicher Verdünnungsstufen (Doppelbestimmung) möglichst unter identischen Bedingungen testen zu können, wurden Kaninchen anti-KAChR Plasmen mit jeweils der gleichen Menge solubilisierten mit ^{125}J - α -BTX komplexierten KAChRs in Mikrotiterplatten inkubiert; der Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Gammaglobulinserum ausgefällt und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Zur Vermeidung von unspezifischem Binden an die Oberfläche der Mikrotiterplatten wurden die Mikrotiterplattennäpfe jeweils zuvor 1 h bei 37° C mit 1% Gelatine in PBS (0,225 ml pro Napf) abgesättigt, die Lösung nach 1 h dekantiert und die Mikrotiterplatten auf Filterpapier trocken geklopft. Anschließend wurde in jedem Napf 0,1 ml solubilisierter KAChR mit sättigenden Konzentrationen ^{125}J - α -BTXs (in 0,125 ml) 7 h bei Raumtemperatur präinkubiert und anschließend mit 0,05 ml (1:100) Verdünnungen (in Puffer II) verschiedener Kaninchen anti-KAChR-Plasmen 9 h bei 4° C inkubiert. Danach wurde der Antigen-Antikörper-Komplex (^{125}J - α -BTX-KAChR-Ak-Komplex) mit einem anti-Kaninchen Ig-Gammaglobulinserum (0,025 ml) 6 h bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend wurden die Mikrotiterplatten 15 min bei 3000 Upm

(1300 g) zentrifugiert (Heraeus Labofuge 6000; Rotor für Mikrotiterplatten), die Überstände vorsichtig unter leichtem Unterdruck (Wasserstrahlvakuum) abgesaugt, die einzelnen Näpfe mit den Immunpräzipitaten ausgeschnitten und in einem Gammstrahlenzähler gezählt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung der anti-KAChR-Plasmen wurde statt des solubilisierten KAChR¹²⁵J- α -BTX Komplexes die äquivalente Puffermenge mit ¹²⁵J- α -BTX in dem Radioimmunoassay eingesetzt.

3.4.2 Nachweis von anti-Rezeptor-Antikörpern bei Myasthenia gravis

Patienten

Solubilisierter Torpedo marmorata, humaner- und Kalbs-AChR wurden 3 h bei 20° C mit sättigenden Mengen ¹²⁵J- α -BTXs inkubiert (maximal 5nM), gefolgt von einer 12-stündigen Inkubation mit je 10 μ l verschiedener Humansenen. (Die Humansenen wurden freundlicherweise von Dr. B. Schalke, Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg, zur Verfügung gestellt). Der Rezeptor-Toxin-Antikörperkomplex wurde mit 0,05 ml Immunopräzipitin (IPP = formalin fixierte Staphylococcus aureus Zellen; 10% ige Suspension (w/v)) präzipitiert und das im Präzipitat gebundene ¹²⁵J- α -BTX von dem freien ¹²⁵J- α -BTX durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Radioaktivität des von den Seren präzipitierten Rezeptor-¹²⁵J- α -BTX-Komplexes im Gammstrahlenzähler bestimmt.

Mit dem solubilisiertem humanen AChR (der freundlicherweise von Frau Dr. I. Kalies, Institut und Poliklinik für klinische Immunologie und Rheumatologie der Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt wurde) wurde der RIA in Eppendorfgefäßen durchgeführt, während die höheren Rezeptorkonzentrationen des solubilisierten Torpedo marmorata

AchRs und des solubilisierten KAChRs es ermöglichten, den RIA in Mikrotiterplatten durchzuführen.

Die anti-KAChR-Ak-Titer wurden bestimmt, indem steigende Mengen (0,005 - 10 μ l) myasthenischer Patientenserum mit konstanten Mengen des solubilisierten KAChR- 125 J- α -BTX-Komplexes inkubiert und präzipitiert wurden. Aus der Anfangssteigung dieser Sättigungskurven wurde die anti-KAChR-Antikörperkonzentration in nmol/Liter Serum berechnet.

3.5. Elektrophoretische Methoden

3.5.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Coomassie Färbelösung:	400 ml dest. Wasser
	100 ml Essigsäure
	500 ml Methanol
	1 g Coomassie Brilliant Blue G-250

Entfärbelösung	:	600 ml dest. Wasser
		100 ml Essigsäure
		400 ml Methanol

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (148) mit 10% Acrylamid im Trenngel (160 * 110 * 1 mm; B * H * T) und 4% Acrylamid im Sammelgel getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,1% SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl pH 8,6 verwendet (148). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 6 mA durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt (2 h Coomassie-Färbelösung, anschließend entfärbt (Entfärbelösung)) oder der 30 - 100fach empfindlicheren Silberfärbung nach Morrissey (149) unterzogen.

Als Molekulargewichtsstandards dienten die folgenden Proteine:

	M _r kD
Phosphorylase b	94
BSA	67
Ovalbumin	43
Carbonat-Hydrolyase	30
Trypsininhibitor (Sojabohne)	20
α-Lactalbumin	14

3.5.2 Transfer von Proteinen aus SDS Gelen auf Nitrocellulosepapier

- "Western-Blot"

Puffer I	20 % Methanol (v/v) 192 mM Glycin 25 mM Tris, pH 8,3
Puffer II	500 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
Puffer III	0,05 % Tween 20 150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
Puffer IV	5 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9,5
Puffer V	5 mM EDTA 20 mM Tris/HCl, pH 8,0

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf angefeuchtetes (Puffer I) Nitrocellulosepapier gelegt und zwischen "Scotch-Brite" und 3M Whatman Filterpapier eingespannt (150). Die Proteine wurden aus dem SDS-Gel elektrophoretisch (in einer Biorad Transblotkammer, gefüllt mit 2,5 Liter Puffer I, 2 h bei 4° C, 220 mA, 50 - 60 V) auf das Nitrocellulosepapier transferiert (151).

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose mit 1% BSA in Puffer II 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt und anschließend mit verdünnten (1:100

bis 1:300) Kaninchenantiseren 3 h bei 20° C inkubiert, nach dreimaligem Waschen mit Puffer III 30 min mit Alkalische-Phosphatase markierten anti-Kaninchen Antikörpern (1:7500 in Puffer III) inkubiert, dreimal gewaschen (Puffer III), gefärbt (Substratpuffer: 20 ml Puffer IV, 132 µl NBT (50 mg/ml 70% Dimethylformamid), 66 µl BCIP (50 mg/ml 70% DMF)) und die Reaktion mit Puffer V gestoppt. Oder die Nitrocellulosestreifen wurden 3 h mit ^{125}J - α -BTX inkubiert, gewaschen (dreimal 20 min mit Puffer III), getrocknet und bei - 70° C 3 - 7 Tage auf einem Fuji-Röntgenfilm exponiert.

3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Lösung A	2 % Na_2CO_3 1% SDS 0,4% NaOH 0,16% Na-Tartrat
Lösung B	4% CuSO_4
Lösung C	100 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B (täglich frisch ansetzen)
Lösung D	1 Teil Folin-Reagens + 1 Teil dest. Wasser (täglich frisch ansetzen)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an Markwell (152), da diese Methode empfindlich ist und in Anwesenheit von Detergentien (2% Triton-X-100, 0,05% Tween 80) funktioniert.

0,3 ml einer proteinhaltigen Lösung wurde mit 1 ml der Lösung C gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 0,1 ml Lösung D gemischt, 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 660 nm gemessen. Mit Rinderserumalbumin als Referenzprotein wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt; der lineare Meßbereich erstreckte sich von 1 - 60 µg Protein/0,3 ml Probe.

3.7. Erzeugung von Antikörpern gegen Acetylcholinrezeptor aus foetalem Kalbmuskel

3.7.1 Immunisierung von Kaninchen

Junge (ca. 1,5 kg) weibliche Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" wurden mit 480 ng K AchR in komplettem Freund'schen Adjuvans intradermal (5 Depots a 0,2 ml) immunisiert. Nach 2 Wochen erfolgte die erste (120 ng K AchR), nach 4 Wochen die zweite Auffrischungsimmunisierung (340 ng K AchR) mit gereinigtem K AchR in inkomplettem Freund'schen Adjuvans (5 Depots a 0,2 ml, intradermal).

3.7.2 Herstellung von Kaninchenplasma

Zur Vermeidung der Blutgerinnung wurden pro ml aufgefangenem Blut 75 Einheiten Heparin vorgelegt. Das Plasma wurde bei 4° C von den zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation (30 min bei 600 g) abgetrennt und bei - 20° C gelagert.

Kaninchen wurden in zeitlich regelmäßigen Abständen aus der Ohrvene geblutet. Myasthenische Kaninchen wurden mit Diethyläther narkotisiert (negativer Kornealreflex) und über Herzpunktion entblutet.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung des Acetylcholinrezeptors aus foetalem Kalbsmuskel

4.1.1. Immobilisierung von α -Neurotoxinen zum Zwecke der Affinitätschromatographie

Zur Reinigung des solubilisierten nAChRs wurde zunächst nach optimalen Bedingungen der Affinitätschromatographie gesucht. Als Affinitätsliganden bieten sich zur Reinigung des nikotinischen AchRs (nAChR) an:

-) niedermolekulare quartäre Ammoniumverbindungen (153,154), die über Abstandshalter (Spacer) kovalent an Sepharose gekoppelt werden. Solche Affinitätsadsorbentien sind aber nur begrenzt zur Reinigung des nAChR einsetzbar, da die Liganden-Rezeptor-Komplexe innerhalb von Sekunden dissoziieren und die Affinitätssäulen deshalb nicht ohne Ausbeuteeinbußen gewaschen werden können (134).

-) monoklonale anti-Rezeptor-Antikörper: Sofern vorhanden, können diese Liganden auch zur affinitätschromatographischen Reinigung des nAChRs eingesetzt werden, schließen aber meist die biospezifische Elution des Rezeptors aus, so daß dieser durch Fremdproteine, bedingt durch die unspezifischen Elutionsbedingungen (1 - 2M NaCl) kontaminiert sein kann (155).

-) α -Neurotoxine (α -Bungarotoxin, α -Cobratoxin), gekoppelt an geeignete Trägermaterialien, sind die zur Reinigung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren am besten geeigneten Affinitätsliganden. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Liganden binden α -Neurotoxine nicht an die Acetylcholinesterase und ermöglichen dadurch die eindeutige Unterscheidung zwischen dem Acetylcholinrezeptor und der

Acetylcholinesterase (134,156). Zudem binden α -Neurotoxine mit hoher Affinität (10^{-11} M - 10^{-12} M) an den nAChR und ermöglichen, im Gegensatz zu den niedermolekularen quartären Ammoniumverbindungen, bei langsamerer Rückreaktionsgeschwindigkeit, die Affinitätssäulen zu waschen und so den AChR von Fremdproteinen abzutrennen. Allerdings erfordert die Anwendung von α -Neurotoxinaffinitätsadsorbentien aufgrund der langsamen Assoziationsgeschwindigkeiten längere Inkubationszeiten (über Nacht) während der Adsorption, während die Desorption des Rezeptors, d.h. die Dissoziation des Rezeptor-Toxin-Komplexes, durch hochaffine, mit dem Toxin kompetierende Liganden beschleunigt werden kann (145,157) und dadurch die biospezifische Elution ermöglicht.

Um den solubilisierten KACHR möglichst quantitativ aus dem Solubilisat (Überstand der Ultrazentrifugation) zu isolieren, wurden drei verschiedene α -Neurotoxinaffinitätsadsorbentien hergestellt und jene α -Neurotoxinaffinitätssäule für alle weiteren KACHR-Reinigungen ausgewählt, mit deren Hilfe der KACHR mit der größtmöglichen Ausbeute isoliert werden konnte. Dazu wurden die drei Affinitätsadsorbentien (A - C, vgl.3.1) alle mit der gleichen Menge solubilisierten KACHRs inkubiert, der KACHR über die Affinitätssäulen, wie beschrieben (s.3.2), gereinigt, und die Ausbeute der über die Säulen gereinigten KACHRs im DEAE-Filtrationstest (s. 3.3.2) bestimmt. In der nachfolgenden Tabelle sind sowohl die Ergebnisse der Toxinkopplung (vgl. 3.1) als auch die Ausbeuten der über diese drei Säulen gereinigten KACHRs zusammengefaßt.

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse der Toxinkopplung und der Ausbeuten des über die Affinitätssäulen A, B, C gereinigten K_{ACh}Rs

α -Neurotoxin Affinitätssäule	zur Kopplung eingesetzte Menge Toxin	gekoppelte Menge des α -Neurotoxins	pmol Ausbeute* des gereinigten K _{ACh} Rs	% Ausbeute des gereinigten K _{ACh} Rs
C	375 nmol	290 nmol	12,2	100
B	375 nmol	270 nmol	9,8	80
A	1,6 μ mol	50 nmol	7,8	60

Affinitätssäule A: α -CTX gekoppelt an CNBr aktivierte Sepharose 4B
 Affinitätssäule B: α -BTX gekoppelt an bereits präaktivierte Agarose
 Affinitätssäule C: α -BTX gekoppelt an bereits präaktivierte Sepharose 4B
 pmol Ausbeute* : Toxinbindungsstellen

Die höchste Ausbeute (12,2 pmol Toxinbindungsstellen) gereinigten K_{ACh}Rs wurde über die mit α -Bungarotoxin gekoppelte Sepharose 4B Affinitätssäule C erzielt, gefolgt von der Affinitätssäule B (α -Bungarotoxin gekoppelt an Affigel 10); die Ausbeute des über diese Säule gereinigten Kalb-Acetylcholin-Rezeptors betrug 9,8 pmol Toxinbindungsstellen. Die Ausbeute gereinigten K_{ACh}Rs (7,3 pmol Toxinbindungsstellen) war bei der Affinitätssäule A (α -CTX gekoppelt an Sepharose 4B) am geringsten.

Ungewöhnlich erscheint zunächst, daß die höchste Ausbeute gereinigten K_{ACh}Rs über die Affinitätssäule C (α -Bungarotoxin gekoppelte an Sepharose 4B) erzielt wurde, während über die Affinitätssäule A (α -CTX gekoppelt an Sepharose 4B) 40% weniger Rezeptor isoliert werden konnte. Theoretisch hätte man mit dem umgekehrten Resultat gerechnet, daß nämlich die Elution des Rezeptors von der α -Cobratoxin-Affinitäts-

säule aufgrund des niedrigeren K_D -Wertes ($K_D = 10^{-11}$ M) gegenüber der α -BTX-Affinitätssäule (wegen des höheren K_D -Wertes von 10^{-12} M) erhöht sein sollte. Theoretisch hätte auch die Kapazität, d.h. die Toxinbelegungsdichte, der Affinitätssäule A größere Rezeptorausbeuten erwarten lassen, jedoch konnten mit dieser wie auch mit den anderen beiden Affinitätssäulen näherungsweise die gleichen Rezeptormengen isoliert werden (8 - 12 pmol Toxinbindungsstellen isoliert aus ca. 200 ml solubilisiertem KACHR).

Da mit der α -BTX Sepharose 4B Affinitätssäule die Ausbeuten gereinigten KACHRs 20 - 40% höher war als mit den beiden anderen Affinitätssäulen, wurden alle weiteren KACHR Reinigungen mit der Affinitätssäule C (α -BTX gekoppelt an Sepharose 4B) durchgeführt.

4.1.2 Der membrangebundene Rezeptor

Obwohl Gotti (139) wie Einarson (86) Kalbsfoeten gleicher Größe zur Reinigung des KACHRs verwendet haben, war die Konzentration membrangebundenen Rezeptors bei den von Gotti verwendeten Kalbsfoeten verschieden von den von Einarson verwendeten Kalbsfoeten. Unklar ist dabei, ob diese um einen Faktor 2 - 3 voneinander abweichenden Rezeptorkonzentrationen eventuell auf die Verwendung spezieller Muskelpartien zurückzuführen ist. Zu diesem Punkt sind in beiden Arbeiten keine Angaben zu finden.

Bei den eigenen Arbeiten wurde das Muskelgewebe der hinteren Extremitäten foetaler Kälber homogenisiert (s.3.2) und die Konzentration des membrangebundenen Rezeptors über Zentrifugationsbindungstests bestimmt. Zur einfacheren Übersicht und für den direkten Vergleich sind die von Einarson und Gotti publizierten Ergebnisse der KACHR-Reinigung

in Tabelle 3 zusammengefaßt und den eigenen Ergebnissen der K_AchR-Reinigung gegenübergestellt.

Tabelle 3: Vergleich der Rezeptorkonzentrationen membrangebundenen, solubilisierten und gereinigten K_AchRs in zwei verschiedenen Publikationen

	Einarson (86)	Gotti (139)	eigene Daten (n=4)	Einarson : eigene Daten	Gotti : eigene Daten
K _A chR Konzentration nmol / kg Gewebe	4,1 ± 2,4 nmol/kg	2 ± 0,5 nmol/kg	0,8 ± 0,3 nmol/kg	4 - 6	2,5
K _A chR Konzentration des Tritonextrakts	3,3 nmol/kg	0,7 nmol/kg	0,3 nmol/kg	11	2,5
K _A chR Konzentration des gereinigten K _A chRs	1,5 nmol/kg	0,24 nmol/kg	0,1 nmol/kg	15	2,4
Toxinbindungsstellen nmol / mg Protein	5 nmol/mg Protein	6 nmol/mg Protein	1 nmol/mg Protein	5	6

Während die K_AchR Konzentration von Einarson mit dem theoretischen Wert von $4,1 \pm 2,4$ nmol K_AchR/kg Gewebe angegeben wurde (86), konnte über Zentrifugationblindungstests (3.3.1) gezeigt werden, daß bereits in dem zur Rezeptorreinigung eingesetzten Gewebe die K_AchR Konzentration des membrangebunden Rezeptors um einen Faktor 4 - 6 ($0,8 \pm 0,3$ nmol Rezeptor/kg Gewebe) unter dem von Einarson et al. (86) extrapolierten Wert liegt. Folglich müssen alle weiteren, bei der Rezeptorreinigung zu erwartenden Ausbeuten um den Faktor 4 - 6 geringer angesetzt werden.

4.1.3 Solubilisierung des membrangebundenen Kalbsacetylcholinrezeptors

Aufgrund der großen Volumina, der eingeschränkten Möglichkeiten der Homogenisation (5 Liter Labormixer) und der zu Beginn der Präparation limitierten Anzahl von Zentrifugen (zwei GS3 Rotoren mit je einer Zentrifugenkapazität von ca. 1,5 Liter) konnten je Rezeptorreinigung maximal nur 300 - 500 g foetales, entbeintes Kalbsgewebe aufgearbeitet werden. Dies entspricht ca. 1/5 - 1/8 der Menge (ca. 2,5 kg) foetalen Kalbsgewebes, das von Einarson et al. (86) zur Reinigung foetalen KACHRs eingesetzt wurde.

Um allerdings überhaupt genügende Mengen des KACHRs aus foetalem Kalbsgewebe isolieren zu können, wurde für die Homogenisation das Puffer-Gewebeverhältnis von 6 : 1 (Einarson et al.) auf 4 : 1 reduziert. Dies ermöglichte die Aufarbeitung von maximal 500 g foetalen Kalbsgewebes je KACHR-Reinigung. Foetales Kalbsgewebe wurde in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren homogenisiert und der membrangebundene KACHR (Sediment II) durch Zentrifugation von löslichen Proteinen abgetrennt.

Während Einarson die Solubilisierung des KACHRs bei einem Puffer-Gewebe Verhältnis von 1,25 : 1 beschreibt (Sediment II) (86), war es unter den von Einarson angegebenen Bedingungen nicht möglich, mit nur einem 1,25fachen Volumenanteil das foetale Kalbsgewebe (Sediment II) zu rehomonisieren und mit Triton-X-100 zu solubilisieren. Statt dessen konnte das Kalbsgewebe (Sediment II) erst bei einem Puffer-Gewebe-Verhältnis von 5 : 1 gut homogenisiert werden und hatte dadurch die geeignete Konsistenz, um den KACHR mit 2% Triton-X-100 zu solubilisieren (s.3.2)

Nach der Solubilisierung wurde die Suspension 1 h in einem Ti 19 Rotor bei 19.000 Upm (53.000 g) in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert und die

löslichen von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Der Überstand mit dem gelösten K_{AChR} wurde durch vier Lagen Nylonwolle filtriert.

4.1.4 Der solubilisierter K_{AChR}

Die Konzentration solubilisierter (Überstand der Ultrazentrifugation; s.3.2) bzw. gereinigten K_{AChR}s (Eluat der HAP-Säule; s.3.2) wurde mit Hilfe eines DEAE-Filtrationstests (s.3.3.2) bzw. eines radioimmunologischen Toxinbindungstests (s. 3.3.3) bestimmt.

Bei dem von Klett (143) eingeführten DEAE-Filtrationstest nutzt man die verschiedenen Ladungseigenschaften des Acetylcholinrezeptors (bzw. AChR-Toxin-Komplexes) und des α -Cobra- bzw. α -Bungarotoxins aus, um die Rezeptorkonzentration zu bestimmen. Solubilisierter bzw. gereinigter K_{AChR} wird mit radioaktiv markiertem Toxin bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts (abhängig von der Rezeptor- und ToxinKonzentration) inkubiert und danach filtriert. Unter neutralen Bedingungen wird der anionisch geladene ^3H - oder ^{125}J - α -Toxin-AChR Komplex von den DEAE-Filtern adsorbiert, während sich das kationische Toxin ($\text{pI} = 5$) (146) durch den Filter durchwaschen läßt. Die Rezeptorkonzentration wird über die von den DEAE-Filtern zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt.

Da die Bindungskapazität der DEAE-Cellulose-Filter begrenzt ist und bei hohen Proteinkonzentrationen überschritten werden kann, wurde zunächst die Kapazität der DEAE-Filter bestimmt. Steigende Mengen des solubilisierter bzw. des gereinigten K_{AChR}s (Überstand der Ultrazentrifugation: $1,88 \pm 0,45$ mg Protein/ml solubilisierter K_{AChR}; $n = 5$; Eluat der HAP-Säule: 12 ± 6 μg Protein/ml gereinigtem K_{AChR}; $n = 11$) wurden mit sättigenden Konzentrationen ^{125}J - α -BTX inkubiert, filtriert und die Radioaktivität des gebundenen ^{125}J - α -BTXs gegen die eingesetzte

Menge solubilisierten (Abb. 2) bzw. gereinigten K_AchRs (Abb. 3) aufgetragen. Aus den Abbildungen (Abb. 2; Abb. 3) geht hervor, daß zwischen der Menge des von den Filtern gebundenen ^{125}J - α -BTX-K_AchR Komplexes und der eingesetzten Menge des Solubilisats bzw. des gereinigten K_AchRs im Meßbereich eine lineare Beziehung besteht. Weder für den solubilisierten noch für den gereinigten K_AchR wurde die Bindungskapazität der DEAE-Cellulose-Filter überschritten (maximal wurden nur 0,05 ml solubilisierter bzw. 0,02 ml gereinigter K_AchR für die Toxinbindungstests eingesetzt). Somit waren die Voraussetzungen zur Charakterisierung und Quantifizierung solubilisierter wie gereinigter K_AchRs stets erfüllt.

Abb. 2

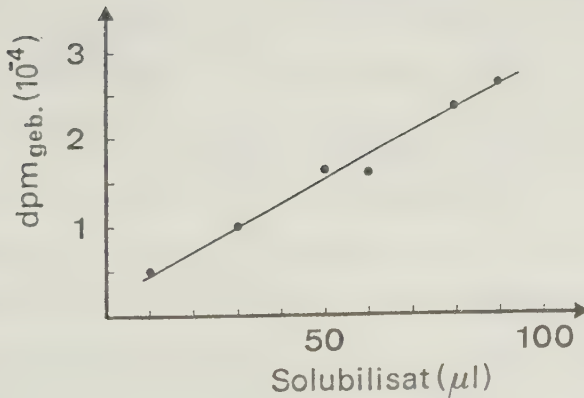


Abb. 2 DEAE-Filtrationstest mit solubilisiertem K_AchR zur Bestimmung der Bindungskapazität der DEAE-Cellulose Filter

Steigende Mengen (0,01 - 0,09 ml) solubilisierten K_AchRs (Überstand der Ultrazentrifugation: 3,9 pM Toxinbindungsstellen, 2,4 mg Protein/ml Solubilisat) wurden in einem Reaktionsansatz von 0,2 ml mit sättigenden Konzentrationen (10 nM) ¹²⁵J- α -BTX 5 h bei Raumtemperatur in Abwesenheit und, zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des ¹²⁵J- α -BTX, in Anwesenheit 250fach molaren Überschusses (2,5 μ M) unmarkierten α -BTXs inkubiert (Vorinkubation mit unmarkiertem α -BTX, 15 min bei 20° C) und die Proben über zwei übereinanderliegende DEAE-Cellulose Filter filtriert (s.3.3.2). Die Radioaktivität unspezifisch gebundenen ¹²⁵J- α -BTXs betrug in allen Meßpunkten ca. 13300 dpm und wurde bei der Auftragung von spezifisch gebundenem ¹²⁵J- α -BTX (die Differenz aus gebundenem und unspezifisch gebundenem ¹²⁵J- α -BTX) gegen die eingesetzte Menge solubilisierten K_AchRs berücksichtigt. Der aus der linearen Regression berechnete Korrelationskoeffizient betrug 0,99.

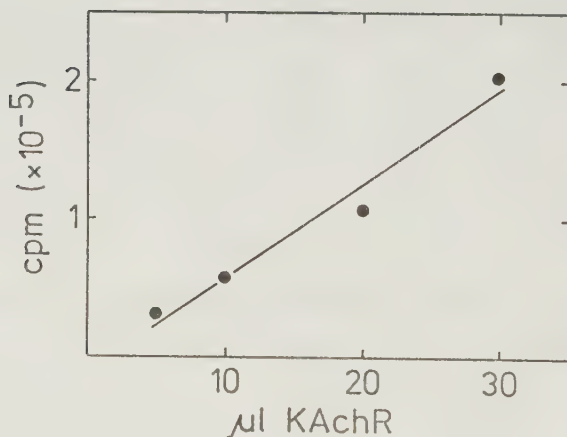


Abb. 3: DEAE-Filtrationstest mit gereinigtem K_AchR zur Bestimmung der Bindungskapazität der DEAE-Cellulose-Filter

Gereinigter K_AchR (Eluat der HAP-Säule: 5,9 nM Toxinbindungsstellen; 0,007 mg Protein/ml gereinigten K_AchRs) wurde in einem Reaktionsansatz von 0,295 ml mit sättigenden Konzentrationen (91,5 nM) ¹²⁵J- α -BTX 21 h bei Raumtemperatur in Ab- und Anwesenheit 100fach molaren Überschusses (9,15 μ M) unmarkierten α -BTXs inkubiert. Danach wurden aliquote Teile des Reaktionsansatzes, entsprechend 5, 10, 20 und 30 μ l gereinigten K_AchRs über zwei übereinanderliegende DEAE-Cellulose-Filter (s. 3.3.2) filtriert und die Radioaktivität spezifisch gebundenen ¹²⁵J- α -BTXs (die Differenz des von dem gereinigten K_AchR gebundenen und unspezifisch gebundenen ¹²⁵J- α -BTXs) gegen die eingesetzte Menge gereinigten K_AchRs aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient, berechnet aus der linearen Regression, betrug 0,98.

4.1.4.1 Quantifizierung der K_{AChR} Konzentration des Solubilisats

Die Konzentration solubilisierten K_{AChR}s wurde in zwei voneinander verschiedenen Testsystemen quantifiziert: nämlich dem DEAE-Filtrationstest (s.3.3.2) und einem radioimmunologischen Toxinbindungstest (s.3.3.3).

Hierdurch sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob in beiden Fällen die gleiche Anzahl von Toxinbindungsstellen gefunden wird und ob die eigenen Rezeptordaten mit den radioimmunologischen Toxinbindungstests von Einarson (86) und Lindstrom (158) vergleichbar sind. Während bei dem DEAE-Filtrationstest innerhalb des linearen Meßbereichs (vgl. Abb. 2, Abb. 3) die Konzentration solubilisierten und gereinigten K_{AChR}s direkt über die Menge gebundenen ¹²⁵J- α -BTXs bestimmt werden kann und die K_{AChR}-Quantifizierung nur durch die Bindungskapazität der DEAE-Filter limitiert ist, sind bei dem radioimmunologischen Toxinbindungstest zur Rezeptorquantifizierung mehrere zusätzliche Voraussetzungen zu erfüllen. Zur Durchführung des Radioimmunoassays ist ein spezifisches anti-K_{AChR}-Antiserum notwendig; dieses anti-Rezeptor-Serum darf in dem immunologischen Toxinbindungstest (s. 3.3.3) weder mit dem radioaktiven ¹²⁵J- α -BTX kreuzreagieren, noch darf es mit diesem um die Toxinbindungsstellen an dem Rezeptor konkurrieren. In dem ersten Fall würde die Kreuzreaktion und damit die Präzipitation des radioaktiven ¹²⁵J- α -BTXs eine höhere Rezeptorkonzentration vortäuschen, während im zweiten Fall die Konkurrenz der Toxinbindung durch das Antiserum eine zu geringe Rezeptorkonzentration anzeigen würde.

Die Kontrollversuche mit den ca. 100 verschiedenen, im Laufe der Arbeit hergestellten anti-K_{AChR}-Antisera zeigten, daß keines der anti-K_{AChR}-Antisera mit ¹²⁵J- α -BTX kreuzreagiert oder mit diesem um

die Bindung an den K_AchR oder den AchR, isoliert aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens, konkurrierte. Der letzte Befund wird durch andere Beobachtungen (27,28,40,126,151) bestätigt, wonach der Anteil der im Serum mit den Toxinbindungsstellen kompetierenden anti-Rezeptor-Ak nur einen Bruchteil (ca. 0,07 - 0,2%; (159)) der anti-Rezeptor-Ak darstellt und unter geeigneten Versuchsbedingungen (Präinkubation des Rezeptors mit dem ¹²⁵J- α -BTX) bei der Berechnung der Rezeptorkonzentration zu vernachlässigen ist.

Frischer solubilisierter K_AchR wurde mit steigenden Konzentrationen ¹²⁵J- α -BTXs in Ab- und Anwesenheit unmarkierten α -BTXs inkubiert und a) die Proben filtriert (DEAE-Filtrationstest) oder b) mit einem anti-K_AchR-Plasma eines myasthenischen Kaninchens (Plasma des Tieres Nr. 4; 4 Tage nach der zweiten Auffrischimpfung) inkubiert. Der Antigen-Ak-Komplex (Ag-Ak-Komplex) wurde im Bereich des Äquivalenzpunktes der Präzipitationsreaktion nach Heidelberger (160) gefällt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des ¹²⁵J- α -BTXs (der Anteil unspezifisch gebundenen ¹²⁵J- α -BTXs betrug im DEAE-Filtrationstest wie im Präzipitationstest ca. 40%; s. Abb. 4A, 5A) wurde mit einem Überschuß (250 nM) unmarkierten α -BTXs (15 min bei 20° C) vorinkubiert. Die Berechnung der Anzahl der Toxinbindungsstellen und die Erstellung der Bindungskurve und des Scatchard-"Plots" erfolgte wie in 4.2. beschrieben.

Für den DEAE-Filtrationstest (Abb. 4) ebenso wie für den radioimmunologischen Toxinbindungstest (Abb. 5) konnte gezeigt werden, daß die Bindung des ¹²⁵J- α -BTXs an den solubilisierten K_AchR sättigbar ist (Bindungskurve der Abb. 4B und 5B) und in einen linearen Scatchard-"Plot" (Abb. 4C, 5C) überführt werden kann. Aus der linearen Regression des

Scatchard-"Plots" wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und die Anzahl der Toxinbindungsstellen berechnet.

Für den radioimmunologischen Toxinbindungstest wie für den DEAE-Filtrationstest wurde die gleiche Anzahl von Toxinbindungsstellen ermittelt (s. Tabelle 2). Verglichen mit dem DEAE-Filtrationstest war im RIA die Konkurrenz der Toxinbindung ($^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$) durch anti-Rezeptor-Ak vernachlässigbar. Die quantitativen Rezeptordaten des Radioimmunoassays (Einarson und Lindstrom et al.; 86,158) waren bei einer Fehlerbreite von ca. 7% direkt mit den quantitativen Daten des DEAE-Filtrationstests vergleichbar.

Tabelle 4: Vergleich der durch zwei verschiedene Bestimmungsmethoden erhaltenen Konzentration an KÄchR

	DEAE-Filtrationstest	RIA
Toxinbindungsstellen pro 25 µl Solubilisat	15,8 fmol	16,9 fmol
K_D	$4,8 \cdot 10^{-11} \text{ M}$	$4,5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$

Alle weiteren Experimente zur Rezeptorquantifizierung und -charakterisierung solubilisierter und gereinigter KÄchRs wurden mit Hilfe des DEAE-Filtrationstests durchgeführt, da dieser Test schneller und einfacher durchzuführen ist und weil bei der Bestimmung der Rezeptorkonzentration auf ein anti-Rezeptor-Antiserum verzichtet werden konnte.

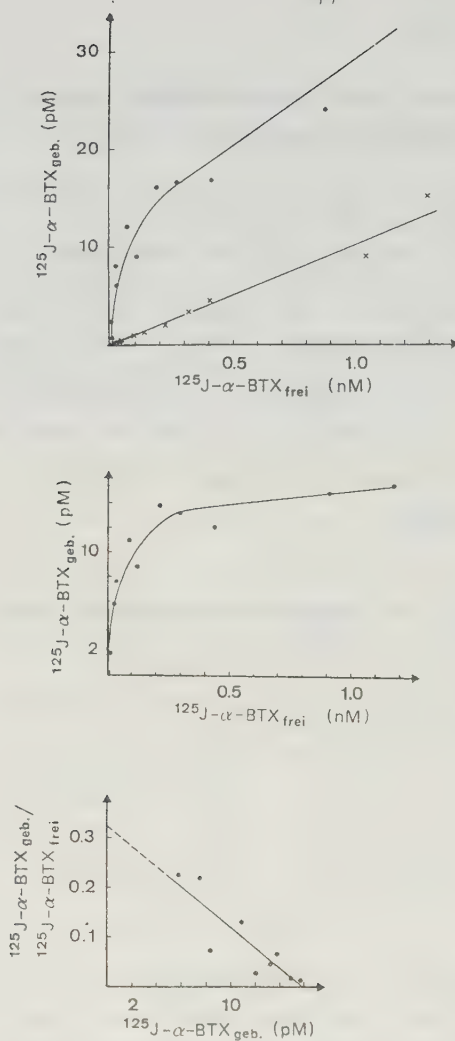


Abb. 4: Quantifizierung der KachR Konzentration des Solubilisats im DEAE-Filtrations-test

0,05 ml solubilisierter KachR (ca. 32 fmol Toxinbindungsstellen, 1,3 mg Protein/ml Solubilisat) wurde mit steigenden Konzentrationen (30 pM - 3 nM) $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ in 2 ml PBS Tween 80 0,05% (s.3.3.2) in Ab- bzw. Anwesenheit von 250 nM unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$ bei 20°C inkubiert, nach 25 h filtriert (s.3.3.2) und die von den DEAE-Filtern zurückgehaltene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler gezählt.

A) Die Konzentration $\bullet-\bullet$ gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ s (in Abwesenheit unmarkierten BTX s) und die Konzentration $\times-\times$ unspezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ s (Vorinkubation (15 min bei 20°C) mit unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$; 250 nM) wurde bestimmt und in der Bindungskurve B) die Konzentration spezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}_{\text{spez.}}$ (C_B) gegen die Konzentration freien $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}_{\text{frei}}$ (C_F) aufgetragen. Aus der linearen Regression des Scatchard-Plot's C) wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und daraus die Anzahl der Toxinbindungsstellen (15,8 fmol Toxinbindungsstellen pro 0,025 ml Solubilisat) bestimmt.

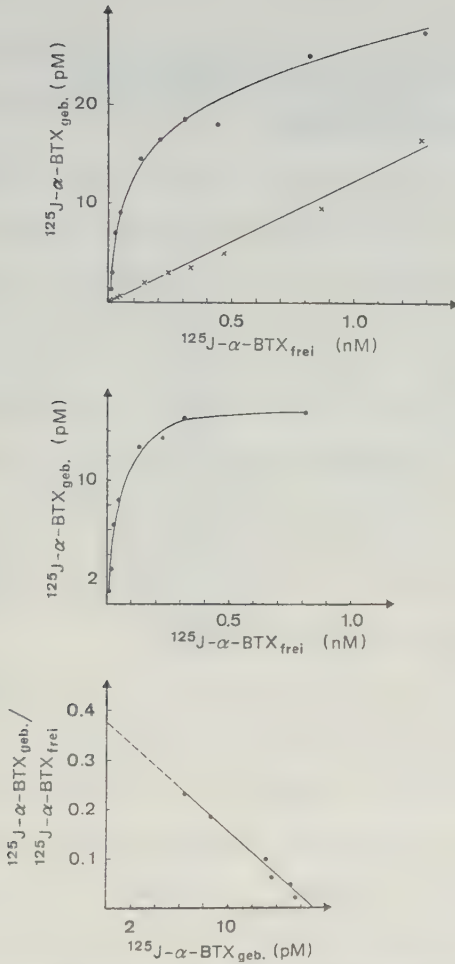


Abb. 5: Quantifizierung der KachR Konzentration des Kalbsolubilisats im radioimmunologischen Toxinbindungstest (RIA)

Solubilisierter KachR (ca. 16 fmol Toxinbindungsstellen/0,025 ml Solubilisat) wurde mit steigenden Konzentrationen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ (10 pM - 3 nM) in Ab- bzw. Anwesenheit unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$ (250 nM) 24 Stunden in 0,85 ml PBS Tween-80 0,05% bei 20°C inkubiert, anschließend mit einem anti-KachR Antiserum inkubiert und der Toxin-Rezeptor-Ak Komplex mit einem anti-Kaninchen Antiserum gefällt. Freies $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ wurde von dem im Niederschlag gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand verworfen und das Immunpräzipitat in einem Gamma Counter gezählt.

A) Die Konzentration $\bullet-\bullet$ gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTXs}$ (in Abwesenheit unmarkierten $\alpha\text{-BTXs}$) und die Konzentration $\times-\times$ unspezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTXs}$ (Vorinkubation (15 min bei 20°C) mit unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$; 250 nM) wurde bestimmt und in der Bindungskurve B) die Konzentration spezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTXs}_{\text{geb.}}$ (C_b) gegen die Konzentration freien $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTXs}_{\text{frei}}$ (C_f) aufgetragen. Aus der linearen Regression des Scatchard-Plots C) wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und daraus die Anzahl der Toxinbindungsstellen (16,9 fmol Toxinbindungsstellen pro 0,025 ml Solubilisat) bestimmt.

4.1.5 Reinigung des solubilisierten foetalen Kalbs-Acetylcholin-rezeptors durch Affinitätschromatographie

Die Konzentration des membrangebundenen K_{AChR}s wurde über Zentrifugationsbindungstests (s. 3.3.1) bestimmt. Aufgrund der Differenz der Toxinbindungsstellen des Membranhomogenats vor (Sediment II; s. 3.2) und nach Solubilisierung (Sediment III; s. 3.2) wurden ca. 85% (n=3) des K_{AChR}s im Solubilisat erwartet (vgl. Tabelle 6). Die Rezeptorkonzentration des Solubilisats, ermittelt durch DEAE-Filtrationstests, betrug jedoch nur ca. 35% der Ausgangsmenge (vgl. Tabelle 3 + 6). Der Verlust (ca. 65%) an Toxinbindungsstellen ist vermutlich durch die hohe Proteaseaktivität dieses Gewebes bedingt. Diese konnte auch nicht durch Zugabe gängiger Proteaseinhibitoren (86,139) (EDTA, Aprotinin, PMSF, Pepstatin A, Jodoacetamid) vollständig inhibiert werden.

Zur affinitätschromatographischen Reinigung des gelösten foetalen K_{AChR}s wurde ein mit dem α -BTX gekoppeltes Sepharose 4B-Affinitätsadsorbens verwendet. Verglichen mit anderen Affinitätssäulen (α -CTX gekoppelt an Sepharose 4B, α -BTX gekoppelt an Affi-Gel 10) wurde mit dieser α -BTX gekoppelten Sepharose 4B Affinitätssäule die höchsten Ausbeuten gereinigten K_{AChR}s erzielt (vgl. 4.1.1, Tabelle 2).

Der K_{AChR} wurde mit dem Antagonisten Benzoquinonium (1 mM) von der α -Bungarotoxin Sepharose 4B Affinitätssäule eluiert, auf einer nachgeschalteten HAP-Säule vom Liganden befreit und konzentriert, und mit 100 mM Na-Phosphatpuffer 0,05% Tween 80 eluiert. Die Chromatographie auf Hydroxylapatit hat gegenüber der auf Ionenaustauscher (z.B. DEAE-Cellulose) den Vorteil, daß der Rezeptor als Ca⁺⁺ bindendes Protein (161) unabhängig von der Salzkonzentration direkt an die HAP-Säule gebunden werden kann, d.h. Umpufferung auf einen Puffer geringerer

Salzkonzentration (86) unnötig ist. Abbildung 6 zeigt ein typisches Elutionsprofil des KACHRs von der HAP-Säule.

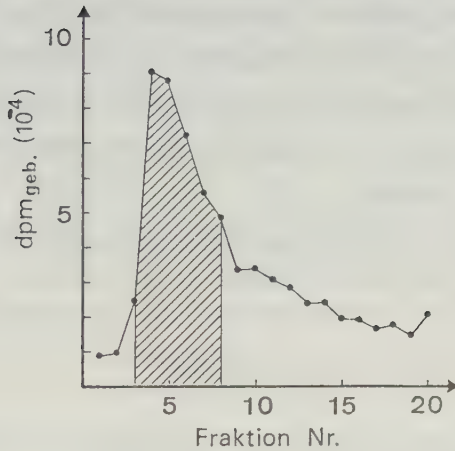


Abb. 6: Elutionsprofil des von der Hydroxylapatitsäule eluierten Kalb-Acetylcholin-rezeptors

Aliquote Teile (20 µl) der Fraktionen (1 - 20) der 100 mM Na-Phosphatpuffer-Elution wurden bei 20° C in einem Reaktionsansatz von 0,16 ml mit ¹²⁵J-α-BTX (400 fmol) inkubiert, nach 2 h filtriert und die von den DEAE-Filtern gebundene Radioaktivität im DEAE-Filtrationstest (s. 3.3.2) nachgewiesen. In dem Elutionsprofil ist die von den DEAE-Filtern gebundene Radioaktivität (dpm_{geb.}) gegen die Fraktionen 1 - 20 der Hydroxylapatitsäule aufgetragen.

4.1.6 Der gereinigte KÄchR

Der KÄchR wurde über Affinitätschromatographie und über die nachgeschaltete Hydroxylapatitsäule mit einer Ausbeute von $25 \pm 8\%$ ($n=4$), bezogen auf die Konzentration im Solubilisat, isoliert. In Tabelle 5 sind die Ausbeuten von vier KÄchR-Reinigungen zusammengefaßt; diese wurden, um sie mit anderen KÄchR-Reinigungen (86,171) zu vergleichen, auf 1 kg foetales Kalbsgewebe bezogen. Die Reinheit des KÄchRs wurde als Anzahl der Toxinbindungsstellen pro mg Protein bestimmt; dabei wurde angenommen, daß zwei Toxinmoleküle ($M_r = 7800$; (162,163)) pro Rezeptormonomer ($M_r \approx 290.000$ D, (147,164)) binden (145). 100% reiner ÄchR hätte daher ca. 7 - 8 nmol Toxinbindungsstellen pro mg Protein.

Tabelle 5: KÄchR Ausbeuten mehrerer KÄchR Reinigungen

Präparation Nr.	nmol Toxinbindungsstellen pro mg Protein	Reinheit (%)	Ausbeute gereinigten KÄchRs (pmol KÄchR/kg Gewebe)
1	1,07	13,2	99
2	1,43	17,8	85
3	0,89	11	114
4	1,24	15,5	104
	$1,2 \pm 0,2$	$14,4 \pm 2,9$	100 ± 12
Die Präparationen Nr. 1 - 4 sind unter identischen Bedingungen zu verschiedenen Zeiten durchgeführt worden. Reinheit (%): Die prozentuale Reinheit des gereinigten KÄchRs bezieht sich auf die Anzahl Toxinbindungsstellen/mg Protein.			

Durchschnittlich wurde aus 300 - 500 g Gewebe ca. 35 - 50 pmol · KÄchR isoliert (Reinheitsgrad ca. 14%). Das Molekulargewicht des gereinigten

KAchRs wurde von Einarson et al. und von Gottl et al. (86,139) durch SDS-Gelelektrophorese und von Noda et al. bzw. Numa et al. (85,110,110,112-114) aus der Aminosäuresequenz berechnet. Die Molmassen der Rezeptoruntereinheiten betragen (berechnete Werte in Klammern) für α : 41.000 (49.000), β : 50.000 (55.000), γ : 52.000 (55.900), δ : 56.000 (56.500) D; das Molgewicht der ϵ -Untereinheit des KAChRs berechnet aus der Aminosäuresequenz beträgt 52.700 D (114). Da der KAChR (139) wie der Torpedo-AchR (147) glykosyliert sind, liegt das tatsächliche Molekulargewicht etwa zwischen 280.000 und 290.000 D (147,164-166).

4.1.7 Zusammenfassung der Solubilisierung und Reinigung des KAChRs

Die während der einzelnen Reinigungsschritte erzielten Ausbeuten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Ausbeuten an nikotinischem KAChR für die einzelnen Präparationsschritte einer Aufarbeitung von 350 g foetalem Kalbsmuskelfgewebes

	Volumen (ml)	Protein (mg)	nmol Toxinbindungs- stellen	* spezifische Aktivität	% Ausbeute	Reinigungsfaktor
Homogenat II (vor Solubilisierung)	450	4994	0,618	123 fmol	100	1
Homogenat III (nach Solubilisierung)	465	4340	0,091	21 fmol	14,7	0,17
berechnete Toxin- bindungsstellen im Solubilisat	n.b.	654	0,527	n.b.	85	n.b.
Solubilisat	427	597	0,212	355 fmol	34	3
Solubilisat vor α -BTX Sepharose 4B Affinitätssäule	300	419	0,148	355 fmol	23	3
gereinigter KAChR; Eluat der HAP-Säule	4,3	0,0456	0,048	1,07 nmol	7,8	8700

n.b. = nicht bestimmt

* spezifische Aktivität: Toxinbindungsstellen/mg Protein

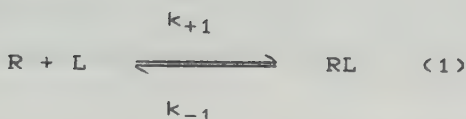
Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die Rezeptorkonzentration zu ca. 0,9 pmol/g Gewebe bestimmt wurde. Die ersten mit der Literatur vergleichbaren Werte der K_{AChR}-Konzentration sind diejenigen des Tritonextrakts, die von Gotti et al. (139) und Einarson et al. (86) als 100%-Wert für ihre Rezeptorpräparationen angesetzt wurden. Die Menge des von Einarson et al. bzw. von Gotti et al. aus 1 kg foetalem Kalbsgewebe solubilisierten Rezeptors betrug 3,3 nmol bzw. 2,1 nmol und liegt damit um einen Faktor 3 - 4 über unseren Werten für den membrangebundenen Rezeptor und um einen Faktor 7 - 11 über unseren Werten für den solubilisierten Rezeptor.

Die Menge an affinitätschromatographisch gereinigtem Rezeptor liegt bei uns um einen Faktor 2,4 unterhalb der von Gotti und um einen Faktor 15 unterhalb der von Einarson angegebenen Ausbeuten.

Die von Einarson et al. (86) erzielten Ausbeuten gereinigten K_{AChR}s erscheinen außerordentlich hoch (1,5 nmol/kg Gewebe) und konnten von uns niemals erreicht werden. Sie sind deshalb entweder auf die unterschiedliche Rasse oder Haltung der verwendeten Kälber oder auf eine Fehlerberechnung der Daten zurückzuführen.

4.2. Wechselwirkung von α -Bungarotoxin und cholinergen Liganden mit dem gereinigten K_{AChR}

Eine zentrale Eigenschaft von Rezeptoren ist ihre Wechselwirkung mit Liganden. Die Ausbildung der Rezeptor-Liganden-Komplexe, d.h. ihre Bildung und Zerfall ist konzentrations-, zeit- und temperaturabhängig. Die Zeitabhängigkeit wird durch die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) beschrieben. Für zwei im Gleichgewicht befindliche Reaktionspartner gilt das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 1) (138).



R = Rezeptorkonzentration
 L = Ligandenkonzentration
 RL = Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes
 k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Dabei werden unter Gleichgewichtsbedingungen gleich viele Rezeptor-Liganden-Komplexe gebildet wie auch zerfallen, d.h. die Nettoreaktion ist gleich Null. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante kann aus Gleichgewichtsbindungskurven bzw. der daraus von Scatchard (167) abgeleiteten Auftragung bestimmt werden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante kann aber auch über die aus kinetischen Versuchen ermittelten Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{+1}) und der Dissoziation (k_{-1}) berechnet werden (Gleichung 2):

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{R * L}{RL} \quad (2)$$

Gemäß dem in Gleichung 1 zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus sollte die Bildung des Rezeptor-Liganden-Komplexes einer Reaktionkinetik 2. Ordnung folgen. Dagegen ist für die Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes eine Reaktionskinetik 1. Ordnung zu erwarten.

Unter der Voraussetzung, daß die Anfangskonzentrationen von Rezeptor (R_0) und Ligand (L_0) und der Wert für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante bekannt sind, kann für jede Rezeptor- und Ligandenkonzentration die Gleichgewichtskonzentration $\bar{x}$ des

Rezeptor-Liganden- Komplexes berechnet werden. Der mathematische Zusammenhang zur Berechnung von $\bar{x}$ unter Einbeziehung des K_D -Wertes und der Variablen R_0 und L_0 wurde von Maelicke et al. (145) hergeleitet und wird durch folgendes Gleichungssystem beschrieben (Gleichung 3):

$$\bar{x} = \frac{R_0 + T_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{R_0 + T_0 + K_D}{2} \right)^2 - R_0 T_0} \quad (3)$$

Die integrierte Form (145) dieser Gleichung (Gleichung 4) ermöglicht es, die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) in Abhängigkeit von der Zeit (t) zu berechnen:

$$k_{+1} = \frac{1}{t} \times \frac{\bar{x}}{\bar{x}^2 - R_0 L_0} \ln \frac{\bar{x} - x}{R_0 L_0 - \bar{x}x} + \ln \frac{R_0 L_0}{\bar{x}} \quad (4)$$

Aufgetragen als Funktion von $\ln ((\bar{x} - x)/(R_0 L_0 - \bar{x}x))$ gegen die Zeit (t) sollten die experimentellen Werte für eine reversible Reaktion 2. Ordnung eine Gerade darstellen, aus deren Steigung die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) zu berechnen ist.

Unterliegt die Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes einer Reaktionskinetik 1. Ordnung so liefert die Auftragung des Logarithmus der Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes in Abhängigkeit von der Zeit eine Gerade. Aus dieser Geraden läßt sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) bestimmen.

Aus den Konzentrationen von R_0 und L_0 und den nunmehr bekannten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{+1}) und der Dissoziation

(k₋₁) läßt sich die Gleichgewichtskonzentration $\bar{x}$ des Rezeptor-Liganden-Komplexes auch für solche Fälle berechnen, bei denen wegen niedriger Rezeptor- und Ligandenkonzentrationen zu lange Reaktionszeiten bis zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts erforderlich wären. In diesem Sinne sollte die aus den kinetischen Experimenten berechnete Gleichgewichtsdissoziationskonstante mit der theoretisch zu erwartenden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Gleichgewichtsbindungs-experimente zu vergleichen sein und mit deren K₀ übereinstimmen (vgl. Abb. 9).

Faßt man die Gleichungen 1 und 2 zusammen (168) und berücksichtigt man gleichzeitig, daß die Rezeptorkonzentration (R_T) die Summe von freiem (R) und mit Ligand komplexiertem Rezeptor (RL) ist, (Gleichung 5)

$$R_T = R + RL \quad (5)$$

so folgt daraus

$$RL = \frac{R_T * L}{K_D + L} \quad (6)$$

Die Gleichgewichtsbindungskurve resultiert aus der Auftragung von spezifisch gebundener Radioaktivität (B = Bound), d.h. der Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes (RL), gegen die freie Radioaktivität (F = Free), d.h. die Konzentration freier Liganden (L). Ist die Bindungskurve hyperbolisch (vgl. Abb. 9B) und verläuft die Scatchard-Auftragung linear (vgl. Abb. 9C) kann auf eine Klasse von Bindungsstellen geschlossen werden. Die Zahl der Ligandenbindungsstellen

kann aus dem Scatchard-"Plot" berechnet werden; die Umrechnung auf die Rezeptorkonzentrationsbestimmung erfordert aber die Kenntnis des molekularen Aufbaus des Rezeptors. Da dieser für den nikotinischen, peripheren AchR bekannt ist (135,138), kann über die Zahl der Liganden-(Toxin)-bindungsstellen die Rezeptorkonzentration bestimmt werden. Im Scatchard-"Plot" entspricht der Schnittpunkt mit der x-Achse der Anzahl der Liganden-(Toxin)-bindungsstellen; da pro Rezeptormonomer zwei Toxine gebunden werden, entspricht die Rezeptorkonzentration der halben Toxinbindungsstellenzahl.

Die mathematische Umformung der hyperbolischen Bindungskurve in ein lineares Gleichungssystem wurde, wie schon dargelegt, von Scatchard vorgenommen (167). Dabei wird das Verhältnis von B/F gegen F aufgetragen (B = RL, Konzentration des an den Rezeptor gebundenen Liganden (Bound); F = Konzentration des freien Liganden (Free)). Bei einem linearen Plot läßt sich aus dem Kehrwert der Steigung die Gleichgewichtsdissoziationskonstante und aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse (B_{max}) die Rezeptorkonzentration bestimmen.

$$\frac{RL}{L} = \frac{R_T}{K_D} - \frac{RL}{K_D} ; \quad \frac{B}{F} = \frac{B_{max}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad (7)$$

Wird die Bindungskurve nicht unter Gleichgewichtsbedingungen gemessen, resultiert ein scheinbarer K_D^* , der je nach Inkubationsbedingungen von dem aus kinetischen Daten berechneten wirklichen K_D verschieden ist.

4.2.1. Kinetik der Assoziation und Dissoziation von α -BTX an den gereinigten K AChR

4.2.1.1 Bestimmung der Anlagerungsgeschwindigkeit (k_{+1}) des ^{125}J - α -BTXs an den gereinigten K AChR

Zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit wurde der gereinigte K AChR mit ^{125}J - α -BTX inkubiert und in Abhängigkeit von der Zeit die Menge des gebildeten Rezeptor-Toxin-Komplexes im DEAE-Filtrationstest bestimmt. Eine Assoziationskinetik ist in Abb. 7 dargestellt.

Abb. 7A

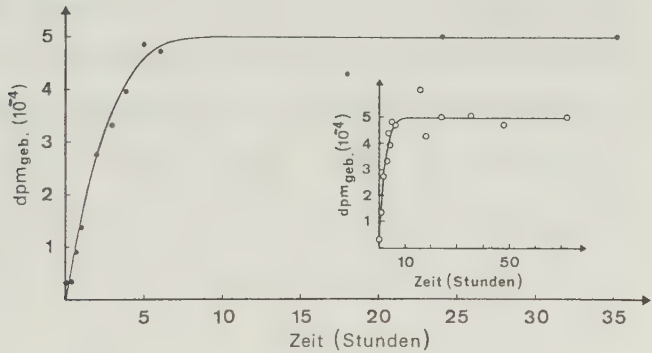


Abb. 7B

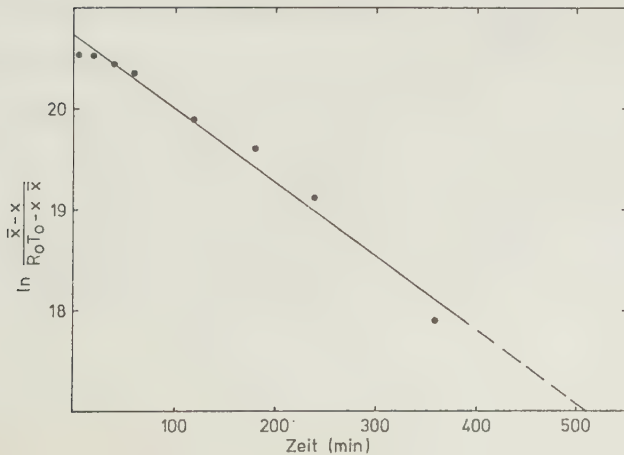


Abb. 7: Kinetik der Assoziation von $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ an den solubilisierten, gereinigten K AChR

Gereinigter K AChR wurde in Abwesenheit und in Anwesenheit von 150 nM unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$ in 2 ml PBS Tween 80 0,05% bei 20° C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten (5 min - 72 Stunden) filtriert (s. 3.3.2) und dann die von den DEAE-Filtern zurückgehaltene Radioaktivität des Rezeptor- $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ -Komplexes in einem Gammastrahlenzähler gezählt. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante wurde aus dem linearen Kurvenverlauf (**Abb. 7B**) aus der Auftragung von $\ln ((\bar{x} - x)/(R_0T_0 - \bar{x}x))$ gegen die Zeit (min) ermittelt. Aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden wurde die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante $k_{+1} = 7,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ berechnet. Die Radioaktivität unspezifisch gebundenen $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTXs}$ (Inkubation in Anwesenheit von 150 nM unmarkiertem $\alpha\text{-BTX}$) war in allen Meßpunkten, unabhängig von der Inkubationsdauer, gleich und wurde bei der Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten berücksichtigt.

$\bar{x}$ = Konzentration des Rezeptor- $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ Komplexes im Gleichgewicht, x = Konzentration des Rezeptor- $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ Komplexes zum Zeitpunkt t , R_0 = Rezeptorkonzentration (Toxinbindungsstellen), T_0 = Konzentration des $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTXs}$. Die Rezeptorkonzentration war $R_0 = 169 \text{ pM}$ (Toxinbindungsstellen), die Konzentration des $^{125}\text{J-}\alpha\text{-BTX}$ betrug $T_0 = 500 \text{ pM}$. Der aus der linearen Regression (**Abb. 7B**) berechnete Korrelationskoeffizient betrug -0,99.

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) wurde aus der Steigung der Auftragung von $\ln ((\bar{x} - x)/(R_0T_0 - \bar{x}x))$ gegen die Zeit (**Abb. 7B**) berechnet ($k_{+1} = 11,1 \pm 5,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $n = 2$). Die Linearität dieser Auftragung zeigt, daß die Assoziation sich wie beim gereinigten Aal-Rezeptor (vgl. Tabelle 8) gemäß einer Reaktion zweiter Ordnung verhält. Die für den gereinigten K AChR ermittelte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante stimmt gut (ca. einem Faktor 2, innerhalb des für eine Reaktion zweiter Ordnung zu erwartenden Genauigkeitsbereiches (169)) mit den für den Katzen- bzw. Aal-AchR ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Toxinassoziation überein. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des Ratten-AchRs ist deutlich verschieden (vgl. Tabelle 7 + 12).

Tabelle 7:

Vergleichende Übersicht über die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) von α -Toxinen an gereinigte Acetylcholinrezeptoren verschiedener Spezies.

Spezies	Ligand	k_{+1} * 10^{-6} ($M^{-1} * min^{-1}$)	Literatur
Ratte	^{125}J - α -BTX	3 - 70	129,154,170
Katze	^{125}J - α -BTX	12	171
Aal	3H - α -CTX	8 ± 2	145
Kalb	^{125}J - α -BTX	11 ± 5	eigene Daten

4.2.1.2 Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1})

Die Dissoziationsgeschwindigkeit eines Rezeptor-Liganden-Komplexes kann auf zweierlei Weise gemessen werden: indem nach Ausbildung des radioaktiven Liganden-Rezeptor-Komplexes der Reaktionsansatz entweder mit einem Überschuß an unmarkiertem Ligand inkubiert wird, oder indem die Probe verdünnt wird (138,145,172,173). Im ersten Fall wird der radioaktive Ligand durch den unmarkierten Ligand vom Rezeptor verdrängt, während im zweiten Fall durch die Verdünnung die Rezeptor- und Ligandenkonzentrationen so weit reduziert werden, daß sich ein neues Gleichgewicht einstellen muß. In beiden Fällen, der Kompetition durch unmarkierten Ligand wie auch in dem Verdünnungsexperiment, sind die Bedingungen so zu wählen, daß die Reassoziations (k_{-1}) ausgeschlossen ist (145,174). Aus der Auftragung des Logarithmus der Konzentration des radioaktiven Rezeptor-Liganden-Komplexes gegen die Zeit sollte, wenn der Rezeptor-Liganden-Komplex nach 1. Ordnung zerfällt, eine Gerade

resultieren, aus deren Steigung die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) zu berechnen ist (145).

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des K AChR - ^{125}J - α -BTX Komplexes wurde, um auf die hohen Konzentrationen unmarkierten α -BTXs verzichten zu können, durch Verdünnung (ca. 800fach) des K AChR - ^{125}J - α -BTX Komplexes bestimmt.

Der gereinigte K AChR wurde mit ^{125}J - α -BTX bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert, danach verdünnt und bei fortschreitender Inkubationsdauer, in Abhängigkeit von der Zeit (5 min - 200 Stunden), die Menge der von den DEAE-Filtern zurückgehaltenen Radioaktivität (des K AChR - ^{125}J - α -BTX Komplexes) bestimmt (s. 3.3.2). Abbildung 8 stellt die Dissoziationskinetik des K AChR - ^{125}J - α -BTX Komplexes dar.

Abb. 8

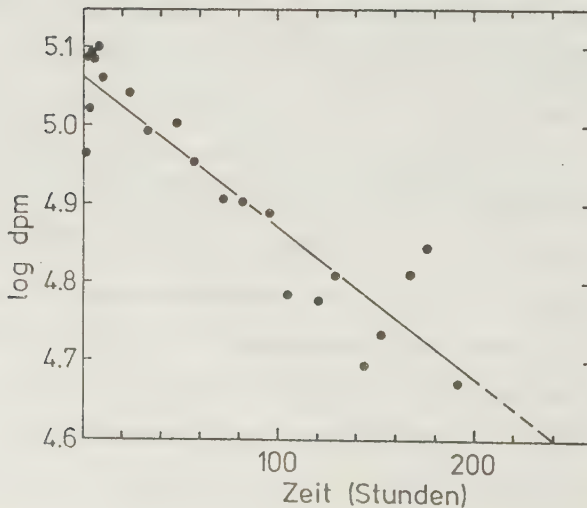


Abb. 8: Dissoziationskinetik des ^{125}J - α -BTX-KAChR Komplexes

In einem Reaktionsvolumen von 1,2 ml wurde solubilisierter, gereinigter KAChR ($1,32 \times 10^{-9}$ M; Toxinbindungsstellen) mit ^{125}J - α -BTX (4×10^{-9} M) 24 Stunden bei 20°C inkubiert und danach 800fach mit Puffer (DEAE-Filterpuffer 0,05% Tween 80, 20°C) verdünnt. Zu den angegebenen Zeiten (5 min - 192 Stunden) wurden aliquote Teile (20 ml) unter Standardbedingungen (s. 3.3.2) filtriert und die Radioaktivität des von den DEAE-Filtern zurückgehaltenen Rezeptor- ^{125}J - α -BTX Komplexes bestimmt. Die berechneten Gleichgewichtskonzentrationen betrugen vor Verdünnung bzw. nach der Verdünnung $1,31 \times 10^{-9}$ M bzw. $1,64 \times 10^{-11}$ M. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante wurde zu $k_{-1} = 7,5 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ berechnet.

Wird die Reassoziationskinetik des Rezeptors und des ^{125}J markierten Toxins durch Verdünnung unterbunden, ist nur ein einfaches, monophasisches Dissoziationsmuster des Rezeptor-Toxin-Komplexes ($k_{-1} = 8,4 \pm 1,3 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$; $n = 2$) zu beobachten, bei dem aus der Dissoziationskinetik nur eine einzige Population eines langsam dissozierenden Komplexes zu erkennen ist ($t_{1/2} = 81 \pm 21$ Stunden; $n = 2$). Diese langsame Dissoziationskinetik des KAChR-Toxin Komplexes ist gut mit der von Maelicke et al. (145) für den Aal-Rezeptor beobachteten zu vergleichen.

Berechnet man aus den in kinetischen Experimenten ermittelten Daten der Assoziation und Dissoziation die Gleichgewichtsdissoziationskonstante so resultiert daraus ein K_D von $7,6 \times 10^{-12}$ M, der gegenüber dem hochaffinen Aal-AChR-Toxin Komplex (145) eine ca. 2,5fach höhere Affinität aufweist und im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem K_D des Aal-AChR-Toxin Komplexes identisch ist.

4.2.2 Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem gereinigten KAChR und

^{125}J - α -BTX

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des solubilisierten, gereinigten KAChRs und des ^{125}J markierten α -Bungarotoxins wurde auch direkt bestimmt und mit den theoretisch zu erwartenden Werten (s. 4.2; Gleichung 3) verglichen. Hierzu wurde der DEAE-Filtrationstest

verwendet. Dazu wurden konstante Mengen gereinigten KACHRs (Eluat der HAP-Säule) mit steigenden Konzentrationen (pM - nM) 125 I-Jod markierten α -BTXs inkubiert, nach 24 Stunden filtriert (s. 3.3.2), und wie beschrieben (s. 4.2) wurde aus dem Scatchard-"Plot" die Gleichgewichtsdissoziationskonstante und die Rezeptorkonzentration über die Anzahl der Toxinbindungsstellen berechnet.

Tabelle 8:

Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Bindungsexperimente (*) zur Bestimmung der scheinbaren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) des solubilisierten, gereinigten KACHRs und des als Ligand verwendeten 125 I-Jod markierten α -Bungarotoxins

Rezeptorkonzentration	Protein μ g/ml	spezifische Aktivität	% Reinheit	K_D * 10^4 M	Korrelations-Koeffizient
14,3	10	1,43	18	4,4	0,98
16,9	19	0,94	11,5	2,52	0,99
16	15	1,2	15,5	1,92	0,98
25,9	23,7	1,1	13,6	2,68	0,91
16,4	6,8	2,4	30	1,88	0,94
18 $\pm$ 4,5	14,9 $\pm$ 6,8	1,4 $\pm$ 0,7	17,7 $\pm$ 8,4	2,7 $\pm$ 1	0,96 $\pm$ 0,03

(*) : Inkubation 24 Stunden bei 20° C

Rezeptorkonzentration: nmol Toxinbindungsstellen pro ml gereinigtem KACHR (Eluat der HAP-Säule)

Spezifische Aktivität: nmol Toxinbindungsstellen pro mg Protein

Korrelationskoeffizient : Korrelationskoeffizient der linearen Regression des Scatchard-"Plots"

% Reinheit : bezogen auf die Anzahl der Toxinbindungsstellen; 100% reiner Rezeptor bindet pro mg Rezeptorprotein ca. 7 - 8 nmol Toxin (vgl. 3.3.2)

Abb. 9 zeigt ein typisches Bindungsexperiment. In Anwesenheit hoher Konzentrationen unmarkierten α -BTXs werden die unspezifischen Toxinbindungsstellen (ca. 24% bei 3 nM ^{125}J - α -BTX) gemessen (untere Kurve in Abb. 9A), während die Summe spezifischer und unspezifischer Toxinbindungsstellen durch die obere Kurve in Abb. 9A repräsentiert wird. Die Bindungskurve (Abb. 9B) ergibt sich aus der Auftragung aus spezifisch gebundener Radioaktivität (^{125}J - α -BTX_{geb.}) - der Differenz aus gebundener Radioaktivität in Abwesenheit (obere Kurve in Abb. 9A) und in Anwesenheit unmarkierten α -BTXs (untere Kurve in Abb. 9A) - gegen die Konzentration ungebundenen ^{125}J - α -BTXs (^{125}J - α -BTX_{frei}). Die Bindungskurve verläuft hyperbolisch und zeigt ein sättigbares ^{125}J - α -BTX-Bindungsverhalten (Abb. 9B, unterer Kurvenverlauf).

In Tabelle 8 sind die aus mehreren Bindungsexperimenten ermittelten scheinbaren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und die aus der linearen Regression der Scatchard-"Plots" berechneten Rezeptorkonzentrationen zusammengefaßt.

Unter den angegebenen Bedingungen (nach 24-stündiger Inkubation bei 20°C; s.3.3.2) wurde für den zu ca. 18% gereinigten KACHR ein K_D von $2,7 \pm 1 \times 10^{-10}$ M ($n = 5$) berechnet.

Aus den kinetischen Daten und den bekannten molaren Konzentrationen von Rezeptor und Ligand resultiert die in Abb. 9B (getrichelte Kurve) dargestellte theoretische Gleichgewichtsbindungskurve. Auffällig dabei ist, verglichen mit der experimentellen Bindungskurve, der nach links verschobene Kurvenverlauf der Anpassungsfunktion, der den Unterschied von Experiment (30 - 90% lges Bindungsgleichgewicht) und Theorie (100% lges Bindungsgleichgewicht) widerspiegelt.

Der aus den kinetischen Experimenten ermittelte $K_D = 7,6 \times 10^{-12}$ M stimmt mit dem aus der theoretischen Bindungskurve berechneten $K_D = 7,6 \times 10^{-12}$ M überein und liegt damit in dem Größenordnungsbereich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (10^{-11} - 10^{-12} M), wie sie von Maelicke (145,157,175), Weber & Changeux (176), Brookes & Hall (170) für den Aal-, Torpedo- und Rattendiaphragma AchR beschrieben wurden.

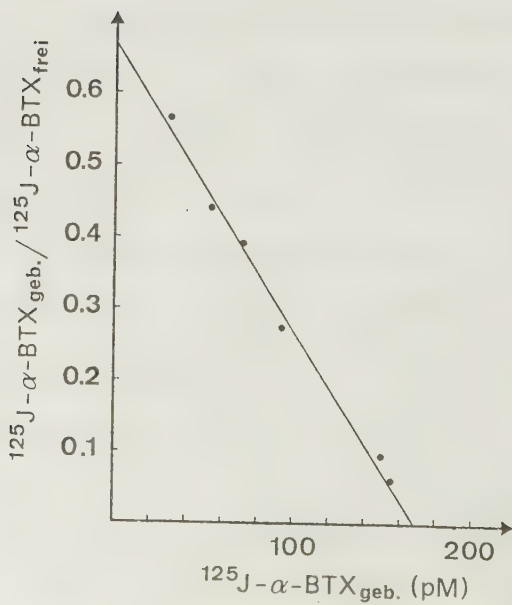
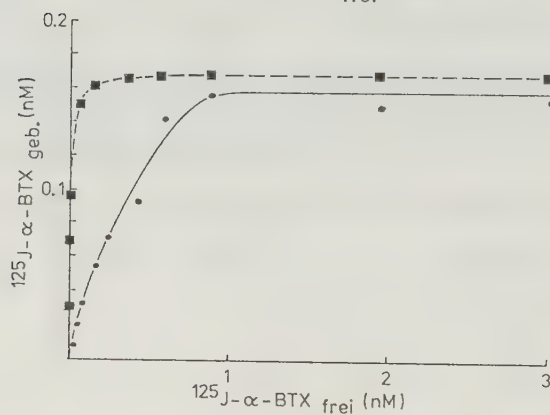
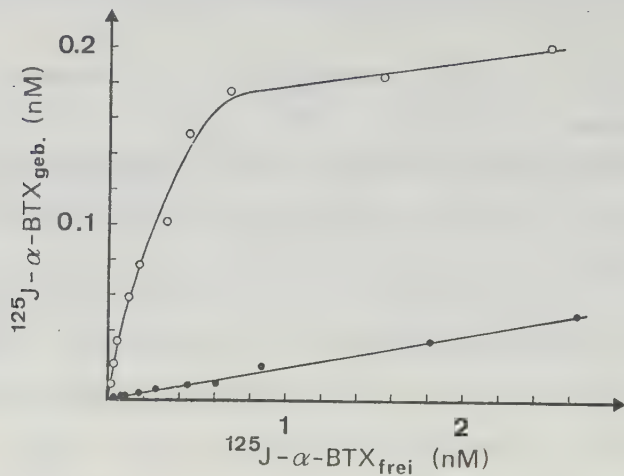


Abb. 9: Wechselwirkung von ^{125}J markiertem α -BTX mit solubilisiertem, gereinigtem K AChR

Gereinigter K AChR (ca. 340 fmol Toxinbindungsstellen, 0,019 mg Protein/ml) wurde mit steigenden Konzentrationen (30 pM - 3 nM) ^{125}J - α -BTX in 2 ml PBS Tween 80 0,05% in Abwesenheit und in Anwesenheit (150 nM) unmarkierten α -BTXs bei 20° C inkubiert, nach 24 Stunden filtriert (s. 3.5.2) und die von den DEAE-Filtern zurückgehaltene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler gezählt.

A) die Konzentration o--o gebundenen ^{125}J - α -BTX (in Abwesenheit unmarkierten α -BTXs) und die Konzentration ●--● unspezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTXs (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde mit 150 nM unmarkiertem α -BTX vorinkubiert (15 min bei 20° C)) wurde im DEAE-Filtrationstest (s. 3.5.2) bestimmt.

B) Bindungskurve: Die Konzentration spezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTX $_{\text{spez.}}$ (C_{B}) wurde gegen die Konzentration freien ^{125}J - α -BTX $_{\text{frei}}$ (C_{F}) aufgetragen; der untere Kurvenverlauf repräsentiert die aus den experimentellen Daten berechnete Bindungskurve, während der obere gestrichelte Kurvenverlauf die theoretisch zu erwartende Gleichgewichtsbindungskurve darstellt (berechnet auf Basis der Anpassungsfunktion Gleichung 3, s. 4.2).

C) Scatchard-"Plot": Aus der linearen Regression des Scatchard-"Plots" wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und daraus die Anzahl der Toxinbindungsstellen (die Rezeptorkonzentration) bestimmt und der K_{D} berechnet. Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_{D}) und der Rezeptorkonzentration erfolgte nach Scatchard (71a) gemäß der Auftragung von $C_{\text{B}}/C_{\text{F}}$ gegen C_{B} (vgl. 4.2).

Aus der Bindungskurve (GEMESSEN) wurde für den Scatchard-"Plot" (der Korrelationskoeffizient der linearen Regression betrug -0,99) die Rezeptorkonzentration 169 pM (Toxinbindungsstellen) und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu $K_{\text{D}} = 2,52 \cdot 10^{-10}$ M berechnet, während auf Basis der Anpassungsfunktion (Gleichung 3) der $K_{\text{D}} = 7,6 \cdot 10^{-12}$ M berechnet wurde (Korrelationskoeffizient = -1, Rezeptorkonzentration = 170 pM Toxinbindungsstellen) und mit dem aus den kinetischen Daten ermittelten $K_{\text{D}} = 7,6 \cdot 10^{-12}$ M übereinstimmt.

Um die Bindungskurven und Scatchard-"Plots" des gereinigten foetalen K AChR s mit einem biochemisch bereits gut charakterisierten nikotinischen AchR einer anderen Tierart vergleichen zu können, wurde der K AChR aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* nach einem in unserem Labor etablierten Standardverfahren gereinigt und unter den gleichen Bedingungen (Rezeptor-, Toxinkonzentration, Puffer, Inkubationszeit) wie für den gereinigten K AChR in Bindungsexperimenten (Abb. 10) eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß bei gleichen Inkubationsbedingungen für den gereinigten Kalb- wie *Torpedo*-AchR Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der gleichen Größenordnung (K AChR : $K_{\text{D}} = 2,7 \cdot 10^{-10}$ M; *Torpedo*-AchR: $K_{\text{D}} = 2 \cdot 10^{-10}$ M) zu beobachten sind. Berücksichtigt man ferner die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation, so zeigt sich, daß Kalb- wie Aal-AchR in ihrem Toxinbindungsverhalten sich weitgehend ähnlich verhalten.

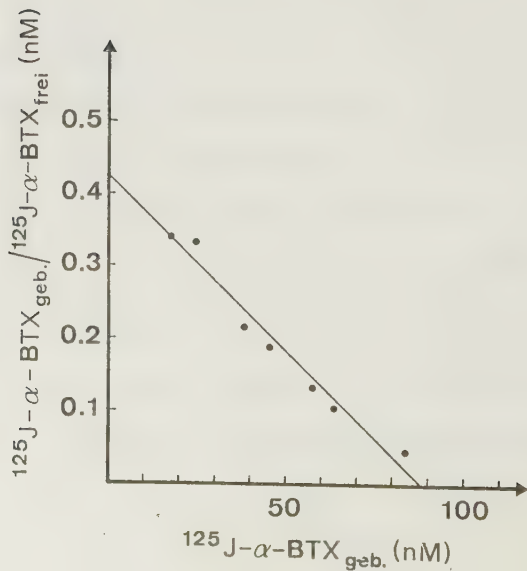
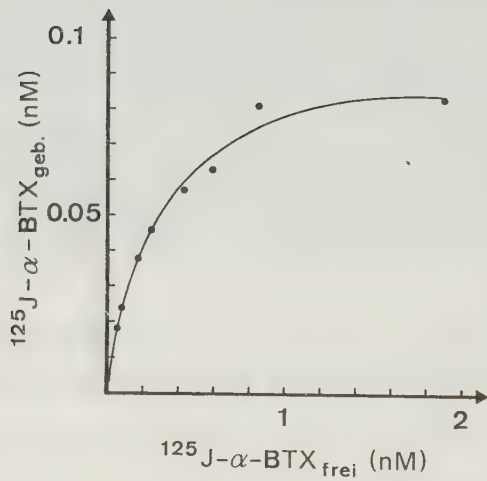
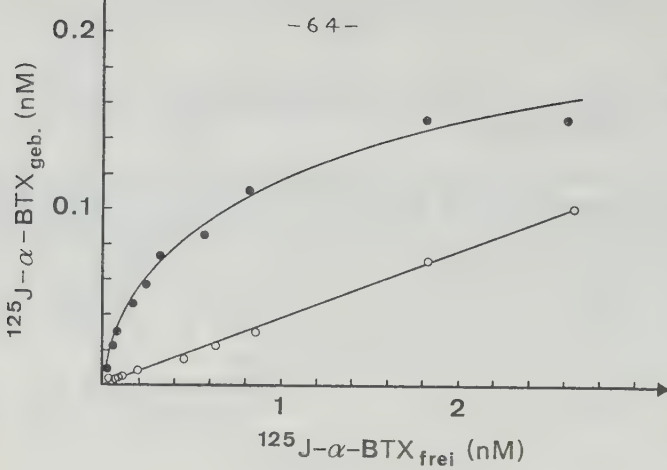


Abb. 10: Wechselwirkung von ^{125}J markiertem α -Bungarotoxin mit dem solubilisierten, gereinigten *Torpedo marmorata* AchR

Gereinigter *Torpedo*-AchR (ca. 43 fmol Toxinbindungsstellen, 0,7 μg Protein/ml) wurde mit steigenden Konzentrationen (30 pM - 3 nM) ^{125}J - α -BTX in 0,5 ml PBS Tween 80 0,05% in Abwesenheit und in Anwesenheit von 200 nM unmarkiertem α -BTX bei 20° C inkubiert, nach 24 Stunden filtriert (s. 3.5.2) und die von den DEAE-Filtern zurückgehaltene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler gezählt.

A) Die Konzentration $\bullet-\bullet$ gebundenen ^{125}J - α -BTXs (in Abwesenheit unmarkierten α -BTXs) und die Konzentration $\circ-\circ$ unspezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTXs (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde mit 200 nM unmarkiertem α -BTX vorinkubiert (15 min bei 20° C)) wurden im DEAE-Filtrationstest bestimmt und die Konzentration gebundenen und unspezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTX_{geb.} gegen die Konzentration freien ^{125}J - α -BTX_{frei.} aufgetragen.

B) Bindungskurve: Die Konzentration spezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTX_{geb.} (C_b) ist gegen die Konzentration freien ^{125}J - α -BTX_{frei.} (C_f) aufgetragen und wird durch die hyperbolische Bindungskurve dargestellt.

C) Scatchard-Plot: Gemäß der Auftragung von C_b/C_f gegen C_b wurde aus der linearen Regression (Korrelationskoeffizient = -0,96) des Scatchard-Plots der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und daraus die *Torpedo*-AchR Konzentration (86 nM Toxinbindungsstellen) und der $K_D = 2,1 \cdot 10^{-10}$ M berechnet.

4.2.3 Wechselwirkung des solubilisierten gereinigten KACHRs mit anderen cholinergen Liganden

Es sind zwar eine Vielzahl niedermolekularer Liganden (134) für den nikotinischen AchR bekannt, diese sind jedoch bisher nur in seltenen Fällen zu Bindungsstudien eingesetzt worden. Dies ist in ihrer im Vergleich zu den α -Neurotoxinen niedrigen Bindungsaffinität begründet. Niedrigaffine Liganden können nur dann in Bindungsexperimenten direkt zur Rezeptorcharakterisierung eingesetzt werden, wenn die erreichbare Rezeptorkonzentration im Bereich des K_D -Werts liegt (144,177-180). Die Konzentration an membrangebundenen KACHR (vgl. 3.2; Sediment II) betrug jedoch durchschnittlich nur ca. $1 \cdot 10^{-12}$ mol/g Gewebe (n=4), und selbst die Konzentration ca. 8700fach angereicherten KACHRs (Eluat der HAP-Säule) betrug lediglich ca. 10 - 20 nM.

Um dennoch die Wechselwirkung kleiner, niedrigaffiner cholinergischer Liganden mit dem solubilisierten, gereinigten KACHR untersuchen zu

können, wurden Konkurrenzexperimente mit α -BTX durchgeführt. Zwar ist der Materialaufwand für solche Untersuchungen viel geringer, doch liegt er für den KACHR immer noch so hoch, daß nur wenige ausgewählte Experimente durchgeführt werden konnten.

In den Konkurrenzexperimenten wurde die Konzentration von Rezeptor und Inhibitor konstant gehalten, während die Konzentrationen des ^{125}J - α -BTXs variiert wurde. Aus der doppelt reziproken Auftragung (Abb. 11A) wurde für jede Inhibitorkonzentration ein scheinbarer (apparenter) K_{app} bestimmt und im Sekundärplot (Abb. 11B) gegen die Konzentration des Inhibitors, hier Carbamylcholin, aufgetragen (145,157,181). Die Inhibitionskonstante wurde aus den ersten drei Meßpunkten des linearen Meßbereichs des Sekundärplots und dem Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert. Demnach weicht die für den KACHR ermittelte Inhibitionskonstante von Carbamylcholin, $K_i = 14 \mu\text{M}$, von der Inhibitionskonstante, $K_i = 0,7 \mu\text{M}$, des Aal-Rezeptors um ca. einen Faktor 20 ab. Dies ist wohl, wie bereits erwähnt (vgl. 4.2.2), auf die relativ "kurzen" Inkubationszeiten von 24 Stunden zurückzuführen. Dennoch kann aus dem Konkurrenzmuster geschlossen werden, daß Carbamylcholin und α -BTX kompetitiv an den KACHR binden.

Abb. 11A

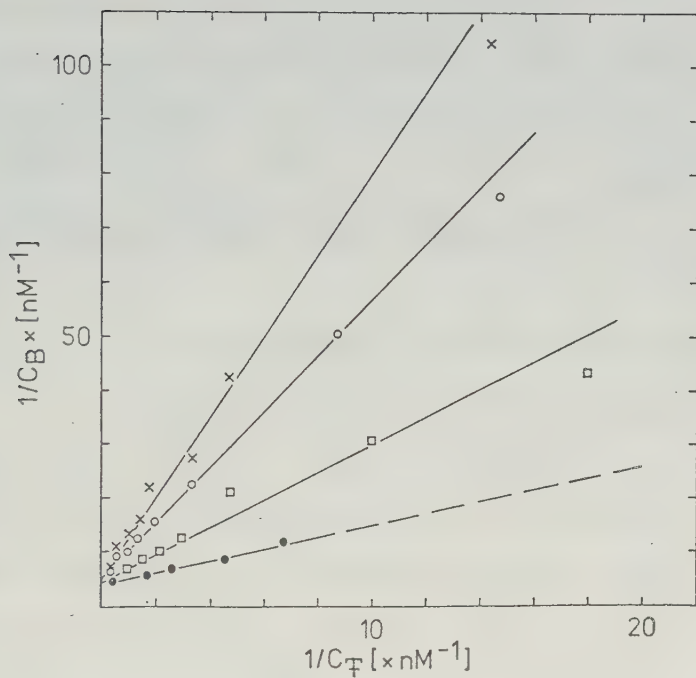


Abb. 11B

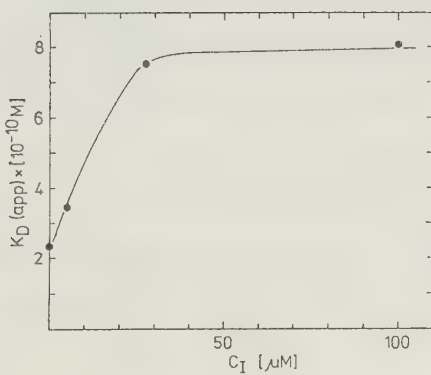


Abb. 11: Kompetitionsbindungsexperimente mit ^{125}J - α -BTX und Carbamylcholin an dem solubilisierten, gereinigten K AChR

A) Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk:

Gereinigter K AChR (100 fmol Toxinbindungsstellen) wurde 30 min bei 20° C mit Carbamylcholin o, I = 0; , I = $5 \cdot 10^{-6}$ M; o, I = $2,7 \cdot 10^{-5}$ M; x, I = $1 \cdot 10^{-6}$ M vorinkubiert, anschließend mit ^{125}J -BTX (30pM - 3 nM) 24 Stunden bei 20° C in 0,5 ml PBS Tween 80 0,05% inkubiert und danach filtriert (s. 3.3.2). Die Konzentrationen spezifisch gebundenen und freien ^{125}J - α -BTXs, wurde wie beschrieben (4.2), berechnet und in der doppelt reziproken Auftragung $1/C_o$ nM $^{-1}$ gegen $1/C_f$ nM $^{-1}$ nach Lineweaver-Burk in Abb. 11A dargestellt.

B) Auftragung der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten $K_{o(\text{app})}$ aus Abb. 11A gegen die Konzentrationen Carbamylcholins. Die Inhibitionskonstante wurde aus den ersten drei Meßpunkten des linearen Meßbereichs des Sekundärplots und dem Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert, $K_i = 14 \cdot 10^{-6}$ M.

4.3 Experimentelle und autoimmune Myasthenia gravis

4.3.1 Induktion der EAMG in Kaninchen mit Säugetier-A ChR

Bislang wurde die EAMG fast ausschließlich (19,86,182) mit dem leicht und in großen Mengen (7,21) zu reinigenden Elektrozyten-A ChR induziert (5,37,54,55,88); die Befunde der EAMG wurden dann in Analogie denen der MG des Menschen gegenübergestellt. Im folgenden wird ein neues Tiermodell der EAMG vorgestellt, das gegenüber bisherigen Tiermodellen den Vorteil hat, daß die EAMG mit einem Säugetier-A ChR induziert werden kann. Es können dadurch solche immunologischen Fragen beantwortet werden, die insbesondere die Immunogenität des Säugetier-A ChR s betreffen. So könnte sich z.B der Fisch-A ChR von dem Säugetier-A ChR immunologisch so unterscheiden, daß zwar mit beiden Rezeptoren die EAMG zu induzieren ist, aber mit dem nikotinischen Säugetier-A ChR andere T- und B-Lymphozyten stimuliert und andere anti-A ChR -Ak produziert werden.

Wir haben für unsere Versuche junge Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" verwendet. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: die Kaninchen 1 - 8 wurden mit gereinigtem K AChR primär in komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert; 14 Tage später erfolgte eine erste Auffrischimpfung mit gereinigtem K AChR in inkomplettem

Freund'schen Adjuvans. Sechs bzw. sieben Tage nach dieser ersten Auffrischimpfung verstarben die Tiere Nr. 2 bzw. 3 infolge der induzierten EAMG. Zwei Wochen nach der ersten Auffrischimpfung wurden die Tiere 1,4,5,6,7,8 mit gereinigtem K_{AChR} in inkomplettem Freund'schen Adjuvans ein drittes Mal immunisiert. Die Versuchstiere 9 und 10 wurden als Kontrollen verwendet, indem ihnen statt des Rezeptors die äquivalente Puffermenge ohne Protein injiziert wurde.

Alle Tiere, Tier 1 - 10, wurden in regelmäßigen Abständen (vgl. Abb. 12A, 12B) geblutet und aliquote Teile des Plasmas im Radioimmunoassay (RIA) (s. 3.4.1) mit dem $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ komplexierten K_{AChR} eingesetzt. Danach wurde der Ag-Ak-Komplex unter optimalen Bedingungen, d.h. im Äquivalenzpunkt der Präzipitationskurve nach Heidelberger (160), mit einem Ziege-anti-Kaninchengammaglobulin-serum ausgefällt. Die von den Seren präzipitierte Menge des K_{AChR}- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ -Komplexes wurde gegen die Zeit aufgetragen und dadurch der Zeitverlauf der humoralen Immunantwort der EAMG, induziert mit gereinigtem K_{AChR}, verfolgt (Abb. 12A, 12B).

Abb. 12A

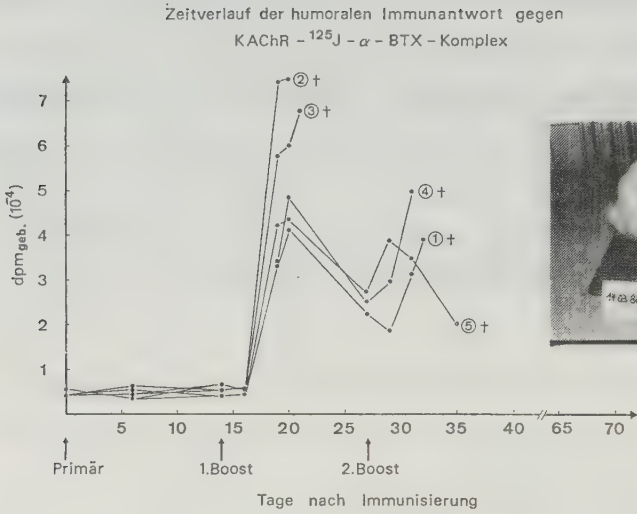


Bild 1

Abb. 12B

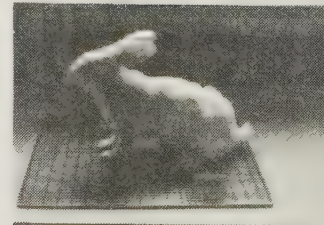
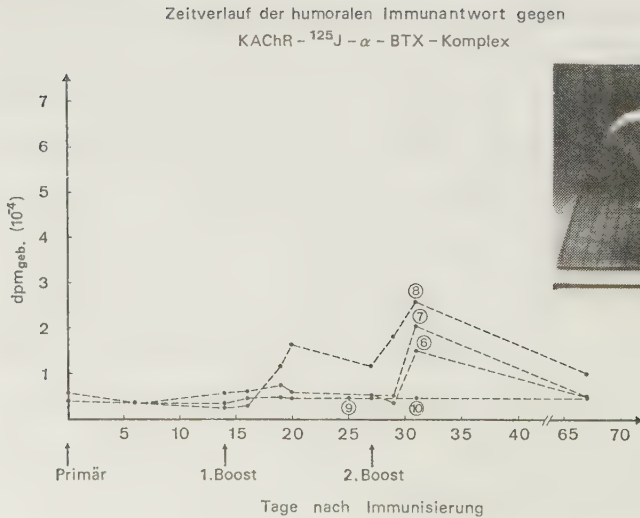


Bild 2

Abb. 12: Zeitverlauf der humoralen Immunantwort der in Kaninchen mit solubilisiertem, gereinigtem nikotinischem Säugetier-AchR induzierten EAMG

Junge Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer", Tier 1 - 8, wurden mit 480 ng gereinigtem K AchR (Eluat der HAP-Säule) in komplettem Freund'schen Adjuvans primär immunisiert (Primär), 14 Tage später erfolgte eine erste Auffrischimpfung (1. Boost) mit 120 ng gereinigtem K AchR in inkomplettem Freund'schen Adjuvans. Die Tiere Nr. 2 und 3 verstarben 6 bzw. 7 Tage nach dieser ersten Auffrischimpfung infolge der induzierten EAMG. 14 Tage nach dieser ersten Auffrischimpfung wurden die Tiere 1,4,5,6,7,8, mit gereinigtem K AchR (340 ng/Tier) in inkomplettem Freund'schen Adjuvans ein drittes Mal immunisiert (2. Boost). Die Versuchstiere (9 + 10) wurden als Kontrollen verwendet, indem sie wie die Versuchstiere (1 - 8) behandelt wurden, wobei ihnen jedoch statt des Rezeptors die äquivalente Puffermenge ohne Protein injiziert wurde. Die Tiere wurden je Injektion mit 1 ml einer Emulsion (1 Teil der Antigenlösung + 1 Teil Freund'sches Adjuvans, 0,2 ml/Injektionsstelle, dorsal, intradermal) immunisiert. Alle Tiere wurden regelmäßig geblutet und die Plasmen in einem Radioimmunoassay (s. 3.4.1) eingesetzt. Dadurch wurden solche Antikörper nachgewiesen, die gegen den K AchR-¹²⁵J- α -BTX-Komplex gerichtet sind. (Antikörper, die gegen die Toxinbindungsstelle des Rezeptors gerichtet sein könnten, werden in diesem RIA nicht nachgewiesen, da der Rezeptor mit dem Toxin komplexiert und damit die Bindungsstelle für anti-Toxinbindungsstellenantikörper blockiert ist.) Die Kaninchenplasmen (je 0,05 ml einer 1:100 Verdünnung) wurden mit 0,1 ml frischem solubilisiertem K AchR (63 fmol Toxinbindungsstellen) und sättigenden Konzentrationen ¹²⁵J- α -BTX (400 fmol) inkubiert. Dann wurde der Komplex aus ¹²⁵J- α -BTX, K AchR und anti-K AchR-Antikörpern mit einem Ziege anti-Kaninchengammaglobulinserum präzipitiert, die im Niederschlag gebundene Radioaktivität des ¹²⁵J- α -BTXs durch Zentrifugation von dem freien ¹²⁵J- α -BTX abgetrennt und die Radioaktivität der Immunpräzipitate in einem Gammastrahlenzähler bestimmt.

Abb. A stellt den Zeitverlauf der humoralen K AchR-Immunantwort der myasthenischen Tiere 1 - 5 dar

Abb. B stellt den Zeitverlauf der humoralen anti-K AchR-Immunantwort von EAMG symptomfreien Tiere 6,7,8 und der Kontrolltiere 9 + 10 dar.

Bild 1: stellt ein typisches EAMG induziertes Kaninchen (Tier Nr. 5) dar. Zum Zeitpunkt der Aufnahme (30 min bevor das Tier narkotisiert und über Herzpunktion entblutet wurde) befand sich das Tier Nr. 5 (8 Tage nach der 2. Auffrischimpfung) bereits im Spätstadium der durch schwere Lähmungserscheinungen charakterisierten EAMG (Ossermann-Klassifikation Stufe 4 (184)).

Bild 2: ist die Aufnahme eines gesunden Kontrolltieres (Tier Nr. 10), welches wie die Versuchstiere behandelt wurde, wobei jedoch statt des Rezeptors die äquivalente Puffermenge zur Immunisierung eingesetzt wurde. In dem Serum dieses als auch des anderen Kontrolltieres (Tier Nr. 9) waren keine anti-K AchR-Ak im RIA (vgl. 3.4.1) nachweisbar. Die Aufnahme des Tieres Nr. 10 entstand 4 Tage nach der 2. Auffrischimpfung; das Tier zeigte auch danach keinerlei myasthenische oder andere krankhafte Symptome

Das Zeichen † in **Abb. 12A** bedeutet, daß die Tiere zu dem angegebenen Zeitpunkt (bei schweren generalisierten Lähmungserscheinungen des gesamten Körpers, okulärer Myasthenie, schwerer werdender Atmung, d.h. kurz vor dem zu erwartenden Tod) narkotisiert und über Herzpunktion entblutet wurden.

Aus den Ergebnissen der Sterblichkeitshäufigkeit K_AchR injizierter und EAMG induzierter Kaninchen (Tabelle 8), den radioimmunologischen Tests (Abb. 12 A, Abb. 12B, Zeitverlauf der humoralen Immunantwort) und den typisch myasthenischen Symptomen der Versuchstiere kann geschlossen werden, daß mit einem gereinigten Säugetier-AchR eine EAMG in Säugern induziert werden kann. Das Modell ist so empfindlich, daß es selbst mit geringen Mengen (120 bis maximal 480 ng) gereinigten nikotinischen Säugetier-AchRs (K_AchR) induziert werden kann, während wesentlich größere Mengen (10 - 1.000fach) von gereinigtem Fisch-AchR (86,158,189) zur Induktion einer EAMG in Säugern notwendig sind.

Aus dem Zeitverlauf der humoralen Immunantwort gegen den K_AchR-¹²⁵J- α -BTX-Komplex wird deutlich (Abb. 12B), daß bereits 4 - 5 Tagen nach der ersten Auffrischimpfung (1. Boost) und vor dem Erscheinen jeglicher myasthenischer Symptome ein drastischer Anstieg der anti-K_AchR-Ak-Antwort in den Plasmen der Tiere 2 und 3 im RIA nachweisbar ist. Dieser Anstieg erreicht am sechsten (Tier 2) bzw. am siebenten Tag (Tier 3) nach der ersten Auffrischimpfung ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt traten die ersten myasthenischen Symptome auf, die sich sehr rasch, d.h. innerhalb von 12 - 36 Stunden verschlimmerten: diese reichten von anfänglich scheinbar unkoordinierten Abläufen bei der Fortbewegung bis hin zur vollständigen Lähmung der Extremitäten und der Nackenmuskulatur. Die schwerer werdende Atmung kann, wenn die Tiere nicht getötet werden, zum Erstickungstod führen. Symptomatisch sind die Tiere, wie in Bild 1, durch ihre unnatürliche Ruheposition, d.h. durch gesenkten Kopf und stark gekrümmten Rücken, gekennzeichnet. Da die Extremitäten wenigstens partiell, meist aber ganz gelähmt sind, war es für die Versuchstiere, selbst auf griffigem Untergrund nicht möglich, sich aufzurichten; sie blieben mit leicht auseinandergerutschten Beinen auf dem Boden liegen. Anzumerken ist außerdem, daß in diesem fortgeschrittenen Stadium (Stufe

4 der Ossermann-Klassifikation (184)) auch die Gesichtsmuskulatur betroffen und u.a. durch herabhängende Augenlider (okuläres myasthenisches Symptom) gekennzeichnet ist (vgl. Bild 1, Tier 5). In diesem Endstadium der EAMG wurden die Tiere narkotisiert (negativer Kornealreflex) und das Blut über Herzpunktion entnommen.

Die Tiere 1, 4, und 5 entwickelten erst ca. 4 - 8 Tage nach der zweiten Auffrischimpfung (2. Boost) deutliche myasthenische Symptome, obwohl schon 2 - 3 Tage nach dieser Immunisierung anti-KAChR-Antikörper meßbar waren. Die Symptome korrelierten dabei individuell mit dem Maximum der anti-KAChR-Ak Antwort; einzige Ausnahme war das Kaninchen Nr. 5, das bei vermindertem anti-KAChR-Ak-Titer 8 Tage nach der zweiten Auffrischimpfung dennoch wie die anderen Tiere durch die charakteristischen myasthenischen Symptome gekennzeichnet war (vgl. Bild 1; Abb. 12).

Abweichend von den Tieren 1, 4 und 5 zeigten die Tiere 6 - 8 selbst nach dreimaliger Immunisierung keine myasthenischen Symptome; insgesamt waren ihre mit dem ^{125}J - α -BTX-KAChR Komplex reagierenden Antikörper bereits nach der ersten Auffrischimpfung deutlich geringer als bei der myasthenischen Tiergruppe (Tier 1 - 5) und blieben auch nach der zweiten Auffrischimpfung unter dem anti-KAChR-Ak-Titer Niveau der Tiere 1 - 5.

In den Plasmen der Kontrolltiere (9 und 10) konnten keine Antikörper nachgewiesen werden, die gegen den ^{125}J - α -BTX-KAChR-Komplex gerichtet waren. Die von diesen Plasmen im RIA unspezifisch präzipitierte Menge ^{125}J -markierten α -BTXs (ca. 2.000 - 5.000 dpm) kam durch unspezifische Bindung zustande. Sie lag weit, d.h. 10 - 20fach unter der von den Plasmen myasthenischer Kaninchen spezifisch gefällten Menge des ^{125}J - α -BTX-KAChR-Komplexes.

Tabelle 9: Übersicht über die Reaktion der Versuchstiere, bei denen EAMG durch Injektion gereinigten K_{AChR}s EAMG induziert wurde

	Kaninchen immunisiert mit K _{AChR}	Kaninchen mit Symptomen der Myasthenia gravis	Kaninchen ohne Symptome
Tier	1 - 8 (100%)	1,2,3,4,5 (63%)	6,7,8 (37%)

In 63% der Fälle (5/8 Kaninchen) dieses Säugetiermodells der experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis genügten bereits 80 - 320 * 10⁻⁶ µg gereinigten Säugetier-K_{AChR}s pro g Kaninchen, um innerhalb von 4 - 8 Tagen nach der ersten bzw. zweiten Auffrischimpfung die MG zu induzieren. In allen Fällen korrelierten die myasthenischen Symptome individuell mit vermehrt an den ¹²⁵J- α-BTX-K_{AChR}-Komplex bindenden Antikörpern.

Keines der aus Kaninchen gewonnenen anti-Kalb-AchR Antiseren reagierte in einem parallel durchgeführten Radioimmunoassay, in welchem statt des solubilisierten K_{AChR}-¹²⁵J- α-BTX-Komplexes der entsprechende ¹²⁵J- α-BTX-Komplex mit AchR von *Torpedo marmorata* eingesetzt wurde. Dies widerspricht älteren Untersuchungen (30), stimmt aber mit neueren Untersuchungen überein (29,86,126). Ergebnisse dieser Art begründen auch, warum neuerdings bevorzugt nikotinischer Säugetier- (120,123,124) bzw. humaner AchR (20,28,40,128,185) zur Bestimmung des anti-AchR-Ak-Titers myasthenischer Patientenserum verwendet wird.

4.3.2. Bindungsstudien mit menschlichem AchR

Humaner, detergentextrahierter AchR wurde als interne Positivkontrolle für die nachfolgenden Radioimmunoassays zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von Human- und Tierseren verwendet. Zunächst wurde jedoch die Rezeptorkonzentration und die scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D^*) des solubilisierten humanen AchRs in Bindungsexperimenten bestimmt. Diese Bindungsexperimente wurden nicht in einem DEAE-Filtrationstest, sondern in einem für den humanen AchR adaptierten Radioimmunoassay (vgl. 3.3.4) durchgeführt. Dies hat den Vorteil, daß die Konzentration an solubilisierten humanen AchRs auch bei hohen Proteinkonzentrationen, d.h. unabhängig von der Bindungskapazität der DEAE-Filter, gemessen werden kann. Zum Vergleich: die Anzahl von Toxinbindungsstellen pro Milligramm Protein betrug für den solubilisierten humanen AchR ca. 16 fmol/mg Protein und für den solubilisierten Kalbsrezeptor durchschnittlich ca. 500 - 700 fmol/mg Protein.

Die unspezifische Bindung des 125 Jod markierten α -BTXs betrug bei dem immunologischen Toxinbindungstest (s. 3.3.4) fast 50 - 60% (vgl. Abb. 13A, unterer Kurvenverlauf) und war ausschließlich auf das zur Präzipitation des Rezeptor-Ak-Komplexes verwendete Immunopräzipitin (IPP = Formalin fixierte Zellen des Stammes *Staphylococcus aureus*) zurückzuführen.

Die Rezeptorkonzentration (Anzahl der Toxinbindungsstellen) und die scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde, wie bereits beschrieben (vgl. 4.2), aus dem Scatchard-"Plot" berechnet. Die aus den Bindungsversuchen für den solubilisierten humanen AchR ermittelte scheinbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante, $K_D^* = 1 \pm 0,1 \cdot 10^{-10}$ M ($n=2$) stimmt zwar mit den von Stephenson (125) und Lindstrom (18) für

den solubilisierten und den gereinigten humanen AchR gefundenen Werten überein, liegt aber dennoch ca. 1 - 2 Größenordnungen unter den kinetisch berechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (10^{-11} - 10^{-12} M) des Aal- und des Torpedo-AchRs (145,157,175,176). Die niedrige Gleichgewichtsdissoziationskonstante des humanen AchRs ist vermutlich auf die zu kurzen Inkubationszeiten bei niedriger Rezeptor- und Ligandenkonzentration zurückzuführen (vgl. 4.2.2; Abb. 9).

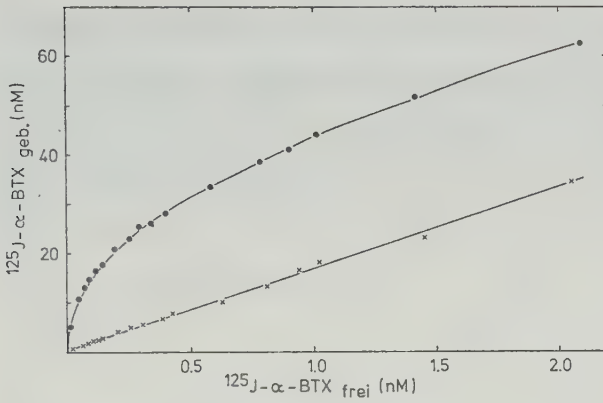


Abb. 13A

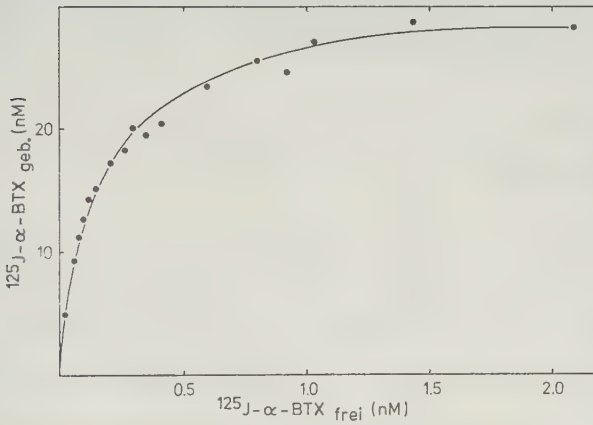


Abb. 13B

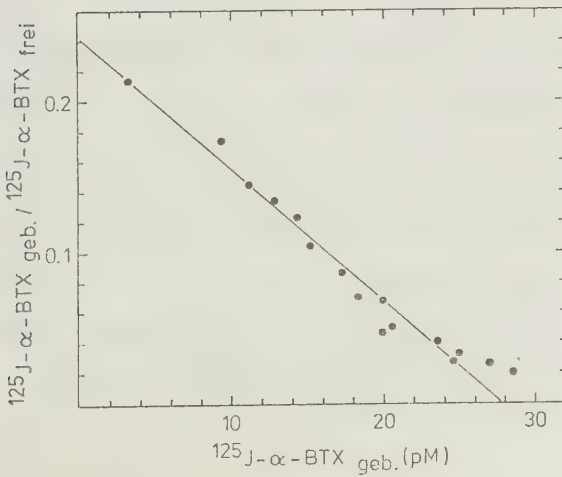


Abb. 13C

Abb. 13: Wechselwirkung von ^{125}J markiertem α -BTX mit solubilisiertem humanem AchR

Solubilisierter humaner AchR (ca. 28 fmol Toxinbindungsstellen, 5,8 mg Protein/ml) wurde mit steigenden Konzentrationen (10 pM - 6 nM) ^{125}J - α -BTX in 0,94 ml PBS Tween 80 0,05% in Abwesenheit und in Anwesenheit (500nM) unmarkierten α -BTXs 19 Stunden bei 20° C in Eppendorfgläsern inkubiert, dann 3 Stunden mit 0,01 ml eines hochtitrigen myasthenischen Patientenserums (Serum Nr. 2) inkubiert, anschließend 3 Stunden mit 0,05 ml IPP inkubiert und der Rezeptor-Toxin-Ak-Komplex präzipitiert. Freies ^{125}J - α -BTX wurde von dem im Niederschlag gebundenen ^{125}J - α -BTX durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand verworfen und die im Sediment gebundene Radioaktivität in einem Gammastrahlenszähler bestimmt.

A) die Konzentration $\bullet\text{--}\bullet$ gebundenen ^{125}J - α -BTXs (in Abwesenheit unmarkierten α -BTXs) und die Konzentration $\times\text{--}\times$ unspezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTXs (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde der Reaktionsansatz 60 min bei 20° C mit 150 nM unmarkiertem α -BTX präinkubiert) wurde im RIA bestimmt.

B) Bindungskurve: Die Konzentration des spezifisch gebundenen ^{125}J - α -BTX_{geb.} (C_b) wurde gegen die Konzentration des freien ^{125}J - α -BTX_{frei} (C_f) aufgetragen.

C) Scatchard-Plot: Aus der linearen Regression des Scatchard-Plots wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse extrapoliert und daraus die Anzahl der Toxinbindungsstellen, 27,8 fmol Toxinbindungsstellen pro 0,3 ml eingesetzten solubilisierten humanen AchRs, bestimmt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante betrug $K_D = 1,1 \cdot 10^{-10}$ M. Der Korrelationskoeffizient betrug -0,98.

4.3.3 Kreuzreaktivität von Humanseren mit Acetylcholinrezeptoren verschiedener Spezies

37 Humanseren wurden in einer kontrollierten doppelt blind durchgeführten Studie auf Reaktivität bzw. Kreuzreaktivität mit Torpedo-, foetalem Kalb- und humanem solubilisiertem AchR- ^{125}J - α -BTX-Komplex getestet (vgl. Tabelle 10). Anschließend wurde der Antikörpertiter der Seren mit ^{125}J - α -BTX komplexierten KAChRs bestimmt (Tabelle 11).

Für den solubilisierten humanen AchR wurde der RIA mit den Humanseren in Eppendorfgläsern durchgeführt, während es die hohen Rezeptorkonzentrationen des AchRs von Kalb (500 - 700 fmol Toxinbindungsstellen/ml Solubilisat) und von Torpedo marmorata (620 pmol Toxinbindungsstellen/ml Solubilisat) ermöglichten, den RIA in wesentlich kleineren Volumina (maximal 150 - 200 μl), d.h. in den Näpfen flexibler Mikrotiterplatten, durchzuführen. Die Rezeptorkonzentration des solubilisierten Kalb- und Torpedo-AchR-Detergensextrakts wurde für

den RIA auf etwa die gleich Anzahl von Toxinbindungsstellen eingestellt (600 - 700 pM Toxinbindungsstellen). Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen der Humansenen mit ^{125}J - α -BTX komplexierten AchRs verschiedener Spezies sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10 : Kreuzreaktivität von Humansenen mit Acetylcholinrezeptoren verschiedener Spezies

Serum Nr.	AchR _{TORPEDO}	AchR _{HUMAN}	AchR _{KALB}	Befund
1	-	+	+	MG
2	+	+	+	MG
3	-	+	+	MG
4	-	+	+	MG
5	-	+	+	MG
6	-	+	+	MG
7	-	+	±	MG
8	-	+	+	MG
9	-	+	+	MG
10	-	+	+	MG
11	-	+	+	MG
12	-	+	+	MG
13	-	+	+	MG
14	-	+	+	MG
15	-	+	+	MG
16	-	+	+	MG
17	-	+	+	MG
18	-	+	+	MG
19	-	+	+	MG
20	-	-	-	MG
21	-	+	-	MG
22	-	+	-	MG
23	-	+	±	okuläre MG
24	-	-	+	Muskeldystrophie
25	+	-	-	Thymitis o. MG
26	-	-	-	Thymom neg.Ak-Titer
27	-	-	-	Boek Myositis
28	-	-	+	MS
29	-	+	+	MS
30	-	-	-	MS
31	-	-	-	MS
32	-	-	-	MS
33	-	-	-	MS
34	-	-	-	Polyneuropathie
35	-	-	-	Gefäßprozeß
36	-	-	-	ohne Befund
37	-	-	-	ohne Befund

In der Tabelle bedeutet: MG = Myasthenia gravis
MS = Multiple Sklerose

Kalb-, Torpedo- und humaner solubilisierter AchR (630 pM Toxinbindungsstellen, 720 pM Toxinbindungsstellen, 28 pM Toxinbindungsstellen) wurden 3 Stunden bei 20° C, mit sättigenden Mengen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ -Konzentrationen (1 - 5 nM) inkubiert, gefolgt von einer 12-stündigen Inkubation mit je 10 μl des jeweiligen Humanserums (Serum Nr. 1-37). Der Ag-Ak-Komplex, der $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX-AchR-Ak-Komplex}$, wurde mit 0,05 ml IPP präzipitiert und das in dem Präzipitat gebundene $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ nach 3 Stunden durch Zentrifugation von dem freien $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Radioaktivität des von den Seren präzipitierten Rezeptor- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX-Komplexes}$ im Gammastrahlenzähler bestimmt. Die Menge des durch die Seren unspezifisch gebundenen $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTXs}$ wurde berücksichtigt und dadurch bestimmt, daß die Bindung der Seren nur an das $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX}$ gemessen wurde.

Die Ergebnisse zeigen, daß die solubilisierten AchRs des menschlichen Muskels und des foetalen Kalbsmuskels gleich gut zum Nachweis von anti-AchR-Antikörpern myasthenischer Patientenserum geeignet sind. Von den eingesetzten 23 myasthenischen Patientenserum reagierten nämlich fast alle. Zusätzlich zu den myasthenischen Patientenserum reagierten allerdings auch die Kontrollserum Nr. 25, 28, 29 und 30 mit dem K AchR- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX-Komplex}$, obwohl diese Patienten keine myasthenischen Symptome aufwiesen. Jedoch lag die Kreuzreaktivität dieser Patientenserum im Grenzbereich (Antikörpertiter ca. 0,7 - 0,8 nmol/Liter Serum) des Radioimmunoassays, so daß nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, daß die Seren tatsächlich anti-AchR-Antikörper enthielten.

Wird allerdings statt der Säugetier-AchRs Fisch-AchR im RIA eingesetzt, so zeigt sich, daß von den 23 (100%) myasthenischen Patientenserum, die mit dem Säugetier-AchR- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX-Komplex}$ reagierten, nur ein Serum mit dem Fisch-AchR- $^{125}\text{J}-\alpha\text{-BTX-Komplex}$ reagierte. Dies bedeutet, daß der Fisch-AchR nicht die Epitope besitzt, gegen die die Antikörper in den anderen Patientenserum gerichtet sind, bzw. daß die Epitope nur begrenzte Ähnlichkeit besitzen, so daß die Affinität der Antikörper für das Binden an den Fisch-AchR deutlich herabgesetzt ist. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, die Sequenzhomologie (vgl. Tabelle 1) insbesondere im Bereich der MIR bei den verwendeten Rezeptoren zu betrachten (85,95,60). In diesem Bereich unterscheidet sich die Sequenz

des Menschen von der des Kalbsrezeptors in nur zwei Aminosäuren (Position 13 und Position 18), während sich die MIR des Torpedorezeptors in 22 von 79 Aminosäuren von der MIR des Menschen unterscheidet. Dies wäre eine plausible Erklärung dafür, daß fast alle Seren myasthenischer Patienten mit dem Säugetier-AchR reagierten, jedoch nur eines mit dem Fisch-AchR reagierte.

4.3.3.1 Bestimmung des anti-AchR-Antikörpertiters myasthenischer Patientenserum mit ^{125}J - α -BTX komplexiertem KAChR

Die anti-AchR-Ak-Titer von 37 verschiedenen Humanserum wurden in einer doppelt blind durchgeführten Studie mit Hilfe des beschriebenen Radioimmunoassays bestimmt. Hierdurch sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob der nur schwer zugängliche humane AchR durch einen anderen Säuger-AchR, welcher leichter und in größeren Mengen und in gleichbleibender Qualität zugänglich ist, ersetzt werden kann.

Die anti-Rezeptor-Ak-Titer ausgewählter, d.h. hoch-, mittel- und niedrigtitriger Humanserum wurden sowohl mit solubilisiertem humanem AchR wie mit solubilisiertem foetalem KAChR, beide komplexiert mit ^{125}J - α -BTX, bestimmt. Die Versuche mit humanem Rezeptor (Seren Nr. 1 - 7) wurden von einem für diese Zwecke eingerichteten Labor (Dr. Kalies, Dr. Schalke) durchgeführt, und die dort bestimmten Werte mit unseren, mit Hilfe des Kalbsrezeptors erhaltenen Werte, (Seren Nr. 1 - 37) verglichen (Tabelle 11).

Voraussetzung zur Bestimmung des anti-Rezeptor-Ak-Titers ist, daß der Rezeptor-Toxin-Ak-Komplex quantitativ präzipitiert wird und damit eine lineare Beziehung zwischen der Menge des präzipitierten AchR-Toxin-Komplexes und der eingesetzten Serummenge besteht. Daß eine solche besteht, ist in Abbildung 14 exemplarisch für die Seren 2,8 und 12 dargestellt.

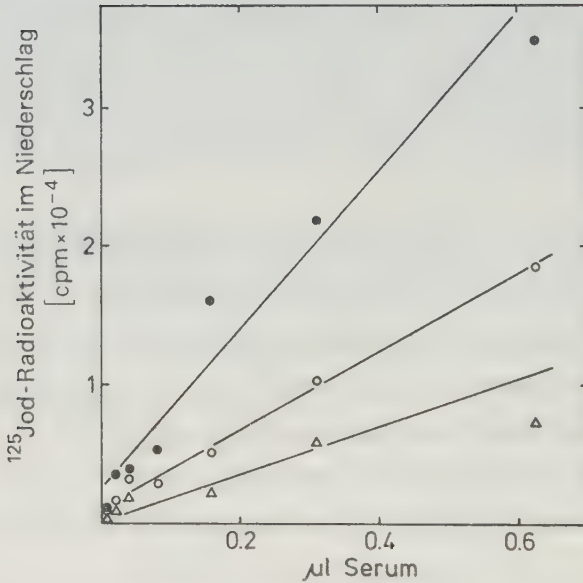


Abb. 14: Prüfung der Linearität des verwendeten Radioimmunoassays

Solubilisierter foetaler K_AchR (120 fmol Toxinbindungsstellen; 0,97 mg Protein/ml Solubilisat) wurde mit sättigenden Mengen ¹²⁵J-α-BTXs (1,3 nmol) in einem Reaktionsansatz von 0,125 ml in eigens dafür vorbereiteten flexiblen Mikrotiterplatten (vgl. 3.4.1) 3 Stunden bei 20° C mit dem ¹²⁵Jod markierten α-BTX inkubiert. Anschließend wurde mit steigenden Mengen (Verdünnungsstufen 2ⁿ; entsprechend 0,005 - 10 µl Serum) myasthenischer Patientenserum (Doppelt- bzw. Dreifachbestimmung) 12 Stunden bei 20° C inkubiert, der Rezeptor-Toxin-Ak-Komplex mit IPP (0,05 ml einer 10%-igen IPP-Suspension) präzipitiert und das in dem Präzipitat gebundene ¹²⁵J-α-BTX von dem freien ¹²⁵J-α-BTX nach 3 Stunden durch Zentrifugation getrennt (15 min, 1300 g; Zentrifuge mit einem Rotorkopf für Mikrotiterplatten). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die in den Immunpräzipitaten gebundene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler bestimmt und gegen die eingesetzte Serummenge aufgetragen. Hochtitrige Seren (anti-AchR-Ak-Titer > 40 nmol/Liter Serum) wurden, um die IgG-Konzentration konstant zu halten, mit PBS, der 5% Humannormalserum (Serum 37) enthielt, verdünnt. Die anti-K_AchR-Ak-Titer wurden auf einen Liter Serum extrapoliert. Die anti-Rezeptor-Ak-Titer betragen für das Serum Nr. 8 150 nml/l, Serum Nr. 2 74 nmol/l und für das Serum Nr. 12 42 nmol/l. Die aus der linearen Regression für die Titrationskurven der Seren 8, 2, 12 berechneten Korrelationskoeffizienten betragen 0,98, 1,0 und 0,97.

Tabelle 11: Anti-AchR-Ak-Titer-Bestimmung mit solubilisierten ^{125}J - α -BTX komplexierten Rezeptoren verschiedener Spezies (Mensch, Kalb-AchR)

Serum Nr.	anti-AchR-Ak-Titer (nmol/Liter Serum)		Befund
	AchR _{HUMAN}	AchR _{KALB}	
1	<300	<150	MG
2	65	74	MG
3	5	4,5	MG
4	4,0	1,7	MG
5	1,4	1,6	MG
6	0,6	1,1	MG
7	1,1	0,7	MG
8	n.b.	<150	MG
9	n.b.	<150	MG
10	n.b.	<150	MG
11	n.b.	<150	MG
12	n.b.	42	MG
13	n.b.	3,8	MG
14	n.b.	2,9	MG
15	n.b.	2,3	MG
16	n.b.	2,2	MG
17	n.b.	1,8	MG
18	n.b.	1,0	MG
19	n.b.	1,0	MG
20	n.b.	0,6	MG
21	n.b.	0,6	MG
22	n.b.	0,6	MG
23	n.b.	0,7	okuläre MG
24	n.b.	0,8	Muskeldystrophie
25	n.b.	0,6	Thymitis o. MG
26	n.b.	0,4	Thymom neg. Ak-Titer
27	n.b.	0,2	Boek Myositis
28	n.b.	0,8	MS
29	n.b.	0,8	MS
30	n.b.	0,4	MS
31	n.b.	0,4	MS
32	n.b.	0,4	MS
33	n.b.	-	MS
34	n.b.	0,6	Polyneuropathie
35	n.b.	0,5	Gefäßprozeß
36	n.b.	0,2	ohne Befund
37	n.b.	0,7	ohne Befund

Die anti-AchR-Ak-Titer im Serum myasthenischer Patienten wurde unter Verwendung von ^{125}J - α -BTX komplexiertem solubilisiertem humanem (AchR_{HUMAN}) und foetalem solubilisiertem Kalbs-AchR-(AchR_{KALB}) bestimmt.

In der Tabelle bedeutet: MG = Myasthenia gravis
MS = Multiple Sklerose
n.b. = nicht bestimmt

Die anti-Rezeptor-Ak-Titer der übrigen Seren wurden unter genau gleichen Bedingungen in Bezug auf den K $\text{AChR}^{125}\text{J}$ - α -BTX-Komplex bestimmt; die Daten sind in der Tabelle 12 zusammengefaßt.

Wird statt des humanen AChRs foetaler Kalbs-AChR im RIA verwendet, so sind in einer doppelt blind durchgeführten Studie fast alle Seren myasthenischer Patienten auch in Bezug auf den foetalen Kalbs-AChR positiv. Von den 37 Seren (ca. 2/3 Myastheniker, ca. 1/3 Kontrollgruppe, d.h. Patienten ohne klinischen Befund oder mit anderen neurologischen Erkrankungen) reagierten 91% aller myasthenischer Patientenseren positiv. Die Seren der Kontrollgruppe (Serum Nr. 24 - 37) reagierten nicht oder nur im unteren Grenzbereich (der Schwellenwert des anti-Rezeptor-Ak-Titers liegt bei diesem RIA bei ca. 0,7 - 0,8 nmol/Liter Serum).

Aus der Bestimmung der anti-Rezeptor-Ak-Titer mit dem solubilisierten foetalen K $\text{AChR}^{125}\text{J}$ - α -BTX-Komplex ergab sich ein "Normalbereich" von $0,5 \pm 0,2$ nmol/Liter Serum (Serum Nr. 24 - 37), während der Ak-Titer myasthenischer Patientenseren in der Regel größer als 0,9 nmol/Liter Serum war.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß der Kalbs-AChR immer dann anstelle des humanen AChRs verwendet werden kann, wenn der im RIA gemessene Titer zwischen ca. 1 - 80 nmol/Liter Serum liegt. Ober- und unterhalb dieser Werte treten deutlichere Schwankungen der anti-AChR-Ak-Titerbestimmung zutage. Diese Ergebnisse sind mit denen von Gotti et al. (124) vergleichbar, die für eine größere Anzahl myasthenischer Patientenseren deren Kreuzreaktionen mit dem foetalen K AChR bestimmt und mit den Antikörpertitern in bezug auf den humanen Rezeptor verglichen haben. Wie wir kommen auch Gotti et al. (124) und Kaufman et al. (123) zu dem Schluß, daß der foetale K AChR gut zum Nachweis myasthenischer Patientenseren geeignet ist. Nach diesen Ergebnissen reagieren 94 - 100%

der myasthenischen Patientenseren auch mit dem foetalen K_AchR-¹²⁵J- α -BTX-Komplex, wobei allerdings unterschiedliche Titerwerte im Vergleich zum humanen AchR auftreten können. Allgemein gilt jedoch, daß Seren mit hohem Titer bezüglich des humanen AchRs auch einen hohen Titer bezüglich des K_AchRs zeigen.

Kaufman und Oger (123) haben auch versucht, den mit dem foetalen K_AchR bestimmten Antikörpertiter myasthenischer Patientenseren mit dem Schweregrad der Krankheit zu korrelieren. Sie fanden, wie andere Autoren zuvor schon für den humanen AchR, daß dies nicht möglich ist.

4.3.3.2 Kreuzreaktivität verschiedener anti-AchR-Antiseren mit solubilisiertem humanem AchR-¹²⁵J- α -BTX-Komplex

So wie myasthenische Patientenseren mit Acetylcholinrezeptoren verschiedener Spezies (Mensch-, Kalb- Torpedo-AchR) unterschiedlich kreuzreagieren, sollten umgekehrt auch verschiedene anti-Rezeptor-Antiseren (anti-Mensch-, anti-Kalb- und anti-Fisch-AchR-Antiseren) auch unterschiedlich mit Säugetier- oder Fisch-AchRs kreuzreagieren. Dies wurde im folgenden untersucht.

Solubilisierter, mit ¹²⁵J- α -BTX komplexierter humaner AchR wurde mit verschiedenen anti-Rezeptor-Antiseren inkubiert und in einem Radioimmunoassay die Kreuzreaktivität bestimmt (Abb. 15).

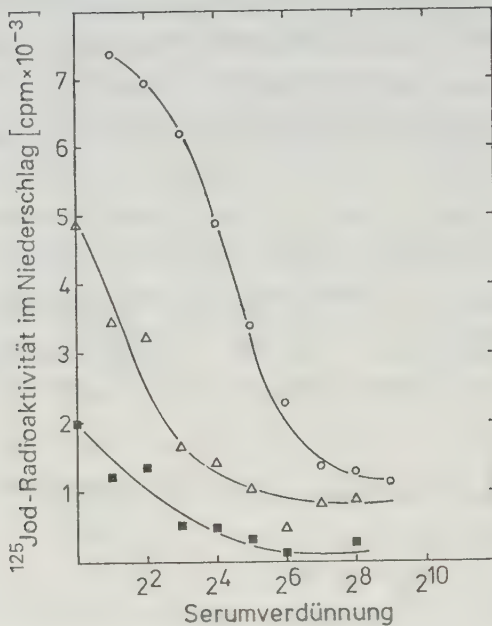


Abb. 15: Kreuzreaktivität verschiedener anti-Spezies-AchR-Antiseren mit dem humanen AchR-¹²⁵J-α-BTX-Komplex

Solubilisierter humaner AchR (ca. 28 fmol Toxinbindungsstellen; 5,8 mg Protein/ml) wurde mit sättigenden Konzentrationen (2 nM) ¹²⁵J-α-BTX in 0,94 ml PBS-Tween 80 0,05% in Eppendorfgläsern 6 h bei 20° C inkubiert, anschließend mit steigenden Mengen (Verdünnungsstufen 2ⁿ, entsprechend 0,05 - 10 µl) anti-Human-, anti-Kalb- und anti-Fisch-AchR-Antiseren 13 h bei 20° C inkubiert (Doppelbestimmungen), und der Rezeptor-Toxin-Ak-Komplex mit IPP (0,05 ml einer 10%-igen Suspension) präzipitiert. Das in dem Immunpräzipitat gebundene ¹²⁵J-α-BTX wurde von dem freien ¹²⁵J-α-BTX nach 3 Stunden durch Zentrifugation getrennt (6 min, 10.000g), der Überstand verworfen und die im Sediment gebundene Radioaktivität in einem Gammastrahlenzähler bestimmt. Die Menge unspezifisch gebundenen ¹²⁵J-α-BTXs wurde (wie in 4.3.2 Abb. 13 beschrieben) bestimmt und bei der Auftragung des von den Seren spezifisch gebundenen ¹²⁵J-α-BTX-Komplexes gegen die eingesetzte Serummenge berücksichtigt.

o--o; Serum eines myasthenischen Patienten (Serum Nr. 2; vgl. Tabelle 10 + 11)

Δ--Δ; Serum eines myasthenischen Kaninchens, welches mit gereinigtem K AchR immunisiert wurde (Tier Nr. 3; Serum der Blutentnahme 6 Tage nach der 1. Auffrischung)

■--■; Serum eines myasthenischen Kaninchens, welches mit gereinigtem nikotinischem Torpedo-AchR immunisiert wurde.

Wie bereits aus den vorausgegangenen Radioimmunoassays zu erwarten war (vgl. 4.3.1; vgl. Tabelle 10 + 11), zeigte sich, daß das myasthenische Patientenserum am besten mit dem humanen AchR reagiert, gefolgt von dem Kaninchen anti-KAchR-Antiserum. Die geringste Kreuzreaktivität mit dem humanen AchR- ^{125}J - α -BTX-Komplex zeigte das anti-Torpedo-AchR-Antiserum, das 1:4 bis 1:8 verdünnt gerade noch mit dem humanen AchR- ^{125}J - α -BTX-Komplex reagiert, während es, wie von Plümer gezeigt werden konnte (186), mit Torpedo-AchR selbst noch bei einer 1 : 250.000 Verdünnung reagiert. Zusammenfassend (vgl. 4.3 - 4.3.3.2; Tabelle 10 + 11) lassen sich die Antiseren graduell nach ihrer Kreuzreaktivität mit den verschiedenen AchRs folgendermaßen einteilen:

Antiserum	Acetylcholinrezeptoren
myasthenische Patientenserum	: Human- > Kalb- >> Torpedo-AchR
Kaninchen anti-KAchR Antiserum	: Kalb- > Human- >> Torpedo-AchR
Kaninchen anti-Torpedo-AchR Anti- serum	Kalb- << Torpedo-AchR Human-

Der durch Immunisierung mit Torpedo-AchR erhaltene, gegen die Bindungsregion des Torpedo-AchRs gerichtete monoklonale Ak WF6 (151) wies ebenfalls keine Kreuzreaktivität mit dem Kalbsrezeptor auf. Von diesem Antikörper ist bekannt, daß er auch mit dem Aal-AchR und (mit wesentlich schwächerer Affinität) mit dem Rattenmuskel-AchR kreuzreagiert (187). Diese erniedrigte Affinität gegenüber Säugetierrezeptoren mag dazu geführt haben, daß eine Bindung an den nur in geringen Konzentrationen vorliegenden KAchR nicht nachweisbar war.

5. Diskussion

Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren des Zitteraals und Zitterrochens sind die biochemisch, elektrophysiologisch, pharmakologisch und immunologisch am besten charakterisierten Neurorezeptoren (135,138). Ihre besondere immunologische Bedeutung ergibt sich aus der Möglichkeit, mit ihrer Hilfe ein Modell der MG, die EAMG, zu erstellen (7). Dazu wird gereinigter AchR in Versuchstiere injiziert, wodurch die EAMG induziert wird. Außerdem kann Fisch-AchR zur kontinuierlichen Restimulierung AchR-spezifischer Säugetier T- und B-Lymphozyten eingesetzt werden (5,36,53,90). Die in-vitro und die in-vivo mit dem Fisch-AchR durchgeführten Versuche haben das Ziel, die Ursachen der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein nikotinischer Säugetier-AchR charakterisiert und zur Induktion der EAMG eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, daß dieser Säuger-AchR dem Fisch-AchR sehr ähnlich ist. In seinen immunologischen Eigenschaften steht er aber dem menschlichen AchR sehr viel näher, so daß er ein wesentlich besseres Modell der Myasthenia gravis liefern kann. Ziel der Arbeit war es, ein auf dem Kalbsmuskel-AchR beruhendes Modell (EAMG) zu erstellen und auf seine Eignung zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der MG sowie zur Diagnose der menschlichen MG zu überprüfen.

Reinigung des nikotinischen Säugetier Acetylcholinrezeptors aus foetalem Kalbsgewebe

Die Reinigung des foetalen KACHRs ging von früheren Arbeiten aus (86,139). Dabei verblieb unklar, ob die Ergebnisse dieser Autoren sich dadurch von unseren unterscheiden, daß sie eine spezielle Rasse oder

spezielle Gewebepräparationen verwendeten, welche ungewöhnlich reich an AchR sind.

Nach Shorr et al. (171) eignet sich bei Katzen das Muskelgewebe der hinteren Extremitäten am besten für die Reinigung des AchRs. Da weder Gotti noch Einarson das von ihnen verwendete Gewebe näher spezifizierten, wurde deshalb das Muskelgewebe der hinteren Extremitäten foetaler Kälber zur Reinigung des KAChRs verwendet.

Bei der Beschaffung und der Vorbereitung des foetalen Kalbsgewebes wurde auf folgende Punkte besonders geachtet: Es wurden stets gleich große (gleichaltrige (141)) Kalbsfoeten ausgewählt. Nach der Schlachtung wurden so schnell wie möglich die hinteren Extremitäten samt Keulenmuskulatur der Kalbsfoeten abgetrennt, die Haut abgezogen (dies erwies sich bei der Reinigung nikotinischen Fisch-AchRs als vorteilhaft), das Gewebe entbeint und sofort zum Transport bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei dieser Temperatur gelagert.

Die Rezeptorausbeuten von Gotti und Einarson variieren um einen Faktor sechs voneinander. So konnte Einarson etwa $1,5\text{ nmol KAChR}$ (ca. $430\text{ }\mu\text{g KAChR}$) aus einem Kilogramm foetalen Kalbsmuskels reinigen, während Gotti aus der gleichen Gewebemenge nur $0,24\text{ nmol KAChR}$ (ca. $70\text{ }\mu\text{g KAChR}$) isolieren konnte. Demzufolge war es angebracht, den KAChR nach der von Einarson beschriebenen Methode aus foetalem Kalbsgewebe zu isolieren.

Aufgrund der zu erwartenden höheren Rezeptorausbeuten wurden die Schritte bis zur Solubilisierung nach Einarson (86) durchgeführt. Dabei ergab sich jedoch, daß im verwendeten Gewebe nur 4 - 6fach geringere Mengen an membrangebundenem AchR als von Einarson angegeben vorlagen (vgl. Tabelle 3 + 6). Dies ist insofern ein indirekter Schluß, als Einarson nicht beschreibt, wie er die Konzentration des

membrangebundenen AchRs bestimmt hat. Dagegen gibt Gotti im Detail die Bestimmungsmethode und die Konzentration des membrangebundenen ("crude homogenate") und des solubilisierten Rezeptors an. Allerdings hat er auch den membrangebundenen Rezeptor durch den DEAE-Filtrationstest bestimmt. Wir haben gezeigt (Abb. 2 und 3), daß der DEAE-Filtrationstest nur in sehr engen Grenzen für die Quantifizierung des solubilisierten und des gereinigten KAChRs, nicht aber zur Quantifizierung des membrangebundenen Rezeptors geeignet ist. Somit verbleibt eine grundsätzliche Unklarheit über die Ausgangsmengen an AchR in den von Einarson et al. (86) und Gotti et al. (68) verwendeten Präparationen. Für das von uns verwendete Ausgangsmaterial gilt jedenfalls, daß es nur etwa 1 pmol AchR pro g enthält.

Die geringen Mengen an AchR im verwendeten Gewebe konnten auch nicht dadurch ausgeglichen werden, daß mehr Gewebe verwendet wurde, weil dies insbesondere die Kapazität unserer Rotoren und Zentrifugen überschritten hätte. Rechnet man Einarsons Protokoll durch, so hätte sich bei 2,5 kg eingesetztem Gewebe nach der Homogenisation (1 Teil Gewebe + 6 Volumenanteile Puffer) ein Volumenzuwachs von 15 Liter Puffer ergeben. Dies zu bearbeiten hätte er 10 Zentrifugen (mit je einem maximalen Fassungsvermögen von 1,5 Liter, unter Verwendung der größten unter normalen Laborbedingungen verfügbaren Rotoren (GS3)) benötigt. Wir haben daher Bedingungen verwendet, bei denen bei teilweise reduzierten Puffer : Gewebe Verhältnissen 300 - 500 g Gewebe in einem Schritt homogenisiert (5 Liter Labormixer) und verteilt auf 2 GS3-Rotoren zentrifugiert wurden.

Allerdings reichte ein Gewebe-Puffer Verhältnis von 1 : 1,25, wie von Einarson beschrieben, nicht aus, um das Sediment, welches aus dem zweiten Zentrifugationsschritt hervorging, zu rehomogenisieren; erst bei

der vierfachen Puffermenge konnte das Kalbsgewebe derart rehomogenisiert werden, daß eine homogene Mischung für die Solubilisierung zur Verfügung stand.

Die Konzentration des membrangebundenen Rezeptors wurde vor und nach der Solubilisierung bestimmt (^{125}J - α -BTX Zentrifugationsbindungstest, vgl. 3.3.1), um daraus die Konzentration des solubilisierten K AChR s zu berechnen und mit der gemessenen Konzentration anderer solubilisierter AChR s vergleichen zu können. Nach der Solubilisierung war noch ca. 15% des AChR s in membrangebundener Form nachzuweisen, so daß demnach 85% des membrangebundenen Rezeptors hätten solubilisiert sein müssen (ohne eine mögliche Denaturierung oder Abbau des Rezeptors bei diesem Schritt zu berücksichtigen). Im Solubilisat waren jedoch nur 35% der Ausgangsmenge nachzuweisen (vgl. Tabelle 3 + Tabelle 6). Der Rezeptorverlust ist wohl, wie auch von Einarson vermutet, auf die hohe Proteaseaktivität des Muskelgewebes zurückzuführen, welche sich auch nicht durch eine Kombination gängiger Proteaseinhibitoren hinreichend blockieren läßt.

Da Gotti et al. und Einarson et al. jedoch nicht die Ausgangsmengen an (membrangebundenem) AChR angeben, läßt sich auch nicht sagen, ob wir mehr oder weniger Verluste bei der Solubilisierung aufzuweisen hatten.

Legt man jedoch die von Gotti und Einarson maximal angegebenen Konzentrationen membrangebunden AChR s zugrunde, so kann geschlossen werden, daß auch diese Autoren ca. 50% des Rezeptors während der Homogenisation und der Solubilisierung verlieren.

Um die relativ kleinen Mengen solubilisierten K AChR s möglichst quantitativ aufarbeiten zu können, wurden besonders hoch affine Liganden (α -Neurotoxine) zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Dabei haben sich α -BTX-Sepharose 4B Säulen als besonders günstig erwiesen.

Hierdurch wurden 20 - 40% höhere Ausbeuten als mit anderen α -Neurotoxinaffinitätssäulen erreicht (vgl. 4.1.1).

Statt Cholat (86,139) wurde zur Solubilisierung und Chromatographie das nichtionische Detergens Tween 80 (143,145), und zur Konzentrierung des KACHRs eine Hydroxylapatitsäule (143) statt einer DEAE-Säule (86) verwendet. Dadurch konnte der KACHR direkt nach Elution von der HAP-Säule in Bindungs- und Funktionsstudien eingesetzt werden. Bezogen auf den Tritonextrakt betrug die Ausbeute an KACHR ca. 25% (vgl. Tabelle 6). Für den gemeinsamen Reinigungsschritt über die α -BTX-Affinitätssäule und die HAP-Säule ergibt sich eine 2700fache Anreicherung. Der Gesamtreinigungsfaktor betrug ca. 8700, wobei der KACHR zu ca. 15% sauber war (Toxinbindungsstellen/mg Protein; vgl. Tabelle 6). Um bei den geringen Mengen gereinigten KACHRs weitere Verluste zugunsten höherer Reinheit zu vermeiden, wurde auf zusätzliche Reinigungsschritte, etwaige Rechromatographie über die α -BTX-Affinitätssäule oder über Lektin- oder Concanavalin-A-Säulen verzichtet.

Biochemische Charakterisierung des KACHRs

Biochemisch und pharmakologisch wurde der KACHR, mit Ausnahme der elektrophysiologischen Untersuchungen des in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierten KACHRs (115-118,188), bisher noch nicht charakterisiert. Aufgrund der geringen Mengen an gereinigtem Rezeptor haben wir nur eine Teilcharakterisierung vornehmen können. Diese betraf insbesondere seine Wechselwirkung mit α -Neurotoxinen, einigen repräsentativen kleinen Liganden und Antikörpern. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 12 mit anderen aus der Literatur bekannten Daten verglichen worden.

Tabelle 12: Vergleich der Toxinbindungseigenschaften des gereinigten foetalen KachRs zu den Toxinbindungseigenschaften nAchRs isoliert aus dem elektrischen Organ (Aal) bzw. dem Muskelgewebe anderer Spezies

	Kalb	Aal	Human	Katze	Ratte	Maus
$k_{-1} \cdot 10^6 \cdot M^{-1} \cdot \min^{-1}$	$11,1 \pm 5,1$	$7,6 \pm 2,1$ (145)	21 (125,127,190)	17,4 (171)	3 - 70 (129,154,170)	n.b. (154,192)
$k_{-1} \cdot 10^{-6} \cdot \min^{-1}$	$8,4 \pm 1,3$	9 (145)	n.b. (125,127,190)	n.b. (171,190)	0,003 - 0,1 (170)	n.b. (154,192)
$t_{1/2}$ (Stunden)	81 ± 21	3 - 125 (145)	n.b. (125,127,190)	n.b. (171,190)	4 - 100 (129,170)	n.b. (154,192)
$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \cdot 10^{-12} M$	7,6	20 - 33 (145)	n.b. (125,127,190)	n.b. (171,190,191)	40 (170)	n.b. (154,192)
$K_{D(\text{Carbamylcholin})} \cdot 10^{-10} M$	$2,7 \pm 1$	1,5 - 15 (145)	1 (eigene Daten) 2 - 5 (125,127)	n.b. (171,190,191)	n.b.	n.b. (154,192)
$K_i \cdot 10^{-6} M^{-1}$ (Carbamylcholin)	14	0,7 (145,157)	n.b. (125,127)	n.b. (68a,107,122)	n.b.	n.b. (154,192)

n.b. = nicht bestimmt
() = Quellenangabe

Für die Wechselwirkung mit α -Toxinen konnte gezeigt werden (vgl. Tabelle 7 +12), daß die Assoziationsgeschwindigkeit des Kalbs-, Aal- und Katzen-AchRs gut miteinander übereinstimmen, wobei der Wert für den Ratten-AchR herausfällt. Auch in Bezug auf die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Spezies sind sich Kalb- und Aal-AchR sehr ähnlich (KAchR: $k_{-1} = 8,4 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, Aal-AchR: $k_{-1} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$) während der Ratten-AchR wiederum herausfällt (170). Sowohl der Ratten- (170) wie der Aal-AchR (145) scheinen eine schnell und eine langsam dissozzierende Toxinbindungsstelle zu besitzen (vgl. Tabelle 12; $t_{1/2} = 3 - 4 \text{ h}$, $t_{1/2} = 100 - 125 \text{ h}$) während für den K AchR unter den gleichen Bedingungen (Verdünnungsexperiment) nur eine langsam dissozzierende Toxinbindungsstelle nachzuweisen war ($t_{1/2} = 81 \pm 21 \text{ h}$; vgl. Abb. 8).

Berechnet man die Gleichgewichtsdissoziationskonstante aus den Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und der Assoziation, so zeigt sich, daß der für den K AchR aus den kinetischen Daten berechnete K_D um einen Faktor 2 - 5 höher ist als der K_D des Aal- bzw. des Ratten-AchRs.

Vergleicht man die aus den kinetischen Experimenten (Abb. 7B, Abb. 8) ermittelten K_D -Werte mit den scheinbaren K_D^* -Werten der Bindungskurven für den Kalb-, Torpedo- und humanen-AchR (18,125) (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 13) resultiert daraus eine scheinbare Diskrepanz zwischen den Bindungskurven und den aus den kinetischen Experimenten zu erwartenden K_D -Werten. Diese Diskrepanz ist auf die zu "kurzen" Inkubationszeiten für die verwendeten Konzentrationen der Reaktanten zurückzuführen. Wollte man die wirkliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D aus Gleichgewichtsbindungskurven bestimmen, so wäre für den Bereich der niedrigen Konzentrationen eine über mehrere Tage andauernde Inkubation erforderlich gewesen (annäherungsweise bestimmt aus der Gleichung $t_{1/2} =$

$0,693 : (k_{-1} * K_D)$; (189)). Solch extrem langen Inkubationszeiten sind für labile Proteine wie Rezeptoren routinemäßig nicht praktikabel, so daß die Bindungsexperimente nach 24-stündiger Inkubation abgestoppt und der scheinbare K_D^* aus den Scatchard-"Plots" berechnet wurde. Sind jedoch, wie im vorliegenden Fall, die Rezeptor- und Ligandenkonzentrationen bekannt und wurden zuvor die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation bestimmt, so kann die für jeden Rezeptor und Ligand charakteristische Gleichgewichtsdissoziationskonstante auch dann berechnet werden, wenn die experimentellen Bedingungen für Gleichgewichtbindungskurven nicht erfüllt sind. Die mathematische Voraussetzung zur Lösung dieses Problems wurde von Maelicke (145) geschaffen und ist auf den K_AchR zu übertragen. Daraus resultiert aus der Anpassungsfunktion die in Abb. 9B für den K_AchR theoretisch dargestellte Gleichgewichtsbindungskurve (gestrichelter Kurvenverlauf in Abb. 9B); der aus den kinetischen Experimenten ermittelte $K_D = 7,6 * 10^{-12} \text{ M}$ liegt in dem Größenordnungsbereich ($10^{-11} - 10^{-12} \text{ M}$) der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Aal-, Torpedo- und Ratten-AchRs.

Für die Säugetier-AchRs aus Maus und Katze sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation noch nicht bestimmt worden. Lindstrom (18) und Stephenson (125) haben zwar versucht, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des solubilisierten und des gereinigten humanen AchRs in Bindungsexperimenten zu bestimmen und finden, wie auch eigene Experimente unter ähnlichen Bedingungen zeigen (Abb. 13), einen K_D^* von etwa $2 - 5 * 10^{-10} \text{ M}$, der auch mit dem scheinbaren des foetalen K_AchRs übereinstimmt, jedoch lassen die eigenen kinetischen Experimente und die von Lindstrom und Stephenson angegebenen

Inkubationsbedingungen vermuten, daß ihre Werte um ca. einen Faktor 10 - 30 unter dem unter dem echten K₀ liegen.

Immunologische Charakterisierung des K_{AChR}s und seine Bedeutung bei der EAMG und der MG

In dieser Arbeit wurde ein neues Tiermodell zur EAMG vorgestellt, das so empfindlich ist, daß wesentlich geringere Mengen, 10 - 1000fach im Vergleich zu Fisch-AchR, genügen, um durch Injektion eine experimentelle Myasthenia gravis in Kaninchen zu induzieren. Die Injektion gereinigten K_{AChR}s ($80 - 320 \times 10^{-6} \mu\text{g K}_{\text{AChR}}/\text{g Kaninchen}$) führte in 5 von 8 Tieren zu schweren myasthenischen Symptomen. Diese Symptome korrelierten zumeist individuell mit dem anti-Rezeptor-Ak-Titer und waren 4 - 8 Tage nach der ersten bzw. zweiten Auffrischimpfung zu beobachten.

Bei dem hier in Kaninchen vorgestellten Tiermodell der EAMG scheint es sich aufgrund der verwendeten Kaninchenrasse ("Weiße Neuseeländer") um sogenannte "high-responder"-Tiere zu handeln. Allerdings sind die Tiere eines Auszuchtstammes genetisch untereinander nicht identisch, so daß auch Tiere vorhanden sind, die schwach reagieren (3 von 8 Tieren entwickelten keine Myasthenie).

Die im Verlauf der Arbeit hergestellten Kaninchen-anti-K_{AChR}-Seren (s.4.3.1) wurden im Radioimmunoassay auf den verschiedenen Rezeptoren (Kalb-, Human-, Torpedo-AchR) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die anti-K_{AChR} Seren nicht nur gut mit dem K_{AChR}, sondern auch mit dem humanen AchR reagierten. Dagegen reagierten die Seren nicht mit Fisch-AchR. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Seren myasthenischer Patienten erhalten werden, die mit dem humanen und dem K_{AChR}, jedoch nicht mit dem Torpedo-AchR reagierten (Tabelle 10 + 11). Im Vergleich

dazu zeigte ein anti-Torpedo-AchR Serum schwache Kreuzreaktivität mit dem humanen AchR (vgl. Abb. 15).

Aufgrund dieser Kreuzreaktivitätsexperimente ist anzunehmen, daß sich Kalb und humaner AchR immunologisch wesentlich ähnlicher sind als gegenüber dem Fisch-AchR. Bisher ist angenommen worden, daß ein Großteil (ca. 50 - 70%) myasthenischer Tier- und Patientenserum Antikörper enthalten (91-94), die gegen die MIR gerichtet sind, wonach zu erwarten wäre, daß wegen der hohen Sequenzhomologie dieser Region starke Kreuzreaktivität zwischen Säugetier- und Fischrezeptor bestehen würde. Dies läßt sich durch unsere Ergebnisse nicht bestätigen. Von den von uns geprüften Seren von Mensch und Kaninchen reagierte nur einziges einziges mit dem Torpedo-AchR. Hieraus muß geschlossen werden, daß die immunologische Eigenschaft von menschlichem Muskelrezeptor und Fischelektrozytenrezeptor doch unterschiedlicher sind als bisher angenommen wurde. Ob dies auf die relativ geringen Sequenzunterschiede der MIR oder darauf zurückzuführen ist, daß ein wesentlicher Anteil der in den menschlichen und Kaninchenserum enthaltenen Antikörper nicht gegen die MIR gerichtet sind, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Wie dem auch sei, so ergibt sich doch daraus, daß das von uns erstellte Modell der MG mit Säugetierrezeptor wesentliche Vorteile gegenüber der früheren Verwendung von Fischrezeptor besitzt. Unter der Voraussetzung, daß (durch bessere Aufreinigungsmethoden bzw. gentechnologische Methoden) größere Mengen von Säugetierrezeptoren zugänglich würden, wären solche Präparationen sowohl zur Diagnose der menschlichen MG wie für die Induktion einer der menschlichen MG genügend ähnlichen EAMG geeignet. Damit bestünde die Hoffnung, im experimentellen Modell die Ursachen dieser schweren Krankheit auf molekularer Ebene aufzuklären und Methoden der Kausaltherapie entwickeln zu können. Jedenfalls habe ich im Rahmen dieser Arbeit genügend Beweise erbracht, um zu zeigen, daß die

auf Fisch-AchR beruhende EAMG nur eine sehr begrenzte Analogie zur menschlichen MG zuläßt und daß ein auf Säugetier-AchR beruhendes Modell wesentlich bessere Analogien besitzt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein neues Tiermodell der Myasthenia gravis, bei welchem erstmals als auslösendes Antigen ein Säugetierrezeptor eingesetzt wurde.

Zum Zwecke der Entwicklung des Modells wurde der nikotinische AchR des foetalen Kalbsmuskels solubilisiert und affinitätschromatographisch ca. 9000fach aufgereinigt. Der Rezeptor wurde außerdem in bezug auf sein Bindungsverhalten gegenüber repräsentativen cholinergen Liganden charakterisiert und die erhaltenen Daten mit denen für AchRs aus anderen Tierarten verglichen. Hierdurch wurde eine hohe funktionelle Analogie zu anderen nikotinischen Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen.

Hierzu im Gegensatz stehen die tiefgreifenden immunologischen Unterschiede zwischen Kalb- und humanem Rezeptor einerseits und den Fischrezeptoren andererseits. Diese wurden mit Hilfe der entsprechenden gereinigten Rezeptoren und einer Vielzahl von selbst präparierten und von anderen Arbeitsgruppen erhaltenen Immunsereen nachgewiesen. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß durch Fischrezeptor induzierte Tiermodelle nur begrenzte Aussagekraft in bezug auf die menschliche MG besitzen.

Deshalb wurde ein neues, auf der Induktion durch den foetalen Kalbsrezeptor beruhendes Tiermodell der MG entwickelt und in bezug auf seine grundsätzlichen Eigenschaften charakterisiert. Der Zeitverlauf der humoralen Immunantwort auf das injizierte Antigen wurde in "high-responder" Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" bestimmt und die erhaltenen Seren in Bezug auf Titer und Kreuzreaktivität gegenüber den menschlichen Rezeptoren charakterisiert. Die Kreuzreaktivität der erhaltenen Seren war im wesentlichen auf Säugetierrezeptoren (einschließlich menschlichem Rezeptor) beschränkt. Außerdem konnte

gezeigt werden, daß sich der foetale Kalbsrezeptor zur immunologischen Diagnose der MG nahezu ebenso gut wie der menschliche Rezeptor eignet.

7. Literaturverzeichnis

1. Scadding G.K. & Harvard C.W.H. (1981)
Progress in myasthenia gravis
Brit. Med. J. 2, 1008 - 1011
2. Hucho F. (1982)
Einführung in die Neurochemie
Verlag Chemie, Weinheim
3. Lindstrom J. & Dau-P (1980)
Biology of myasthenia gravis
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 3311 - 360
4. Saari K.M. (1984)
HLA-system and myasthenia gravis
Acta Ophthalmologica S 165, 92 - 95
5. Pachner A.P. & Kantor F.S. (1985)
Helper T-cell lines for the acetylcholine receptor: Induction
characterization, and in vitro effects
Clin. Immunology an Immunopathology 35, 245 - 251
6. Walker M.B. (1934)
Treatment of myasthenia gravis with physostigmine
Lancet I, 1200
7. Patrick J. & Lindstrom J. (1973)
Autoimmune response to acetylcholine receptor
Science 180, 871 - 872
8. Sugiyama H., Benda P., Meunier J.C. & Changeux J.P. (1973)
Immunochemical characterization of the cholinergic receptor protein
from Electrophorus electricus
FEBS-Letters 35, 124 - 128
9. Souroujon M.C. & Fuchs S. (1986)
Idiotypes and anti idiotypes in experimental autoimmune myasthenia
gravis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 475, 81 - 93

10. Lindstrom J., Einarson B., Lennon V.A & Seybold M.E. (1976)
Pathological mechanism in experimental autoimmune myasthenia gravis.
I. Immunogenicity of syngenic muscle acetylcholine receptor and
quantitative extraction of receptor and antibody-receptor complex from
muscle of rats with experimental autoimmune myasthenia gravis
J. Exp. Med. 144, 726 - 738

11. Lindstrom J., Engel A.G., Seybold M.E., Lennon V.A. & Lambert E.H.
(1976)
Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis
II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in
rats with anti acetylcholine receptor antibodies
J. Exp. Med. 144, 739 - 753

12. Fuchs S., Nevo D. Tarrab-Hazdai R. & Yaari I. (1976)
Strain differences in the autoimmune response of mice to acetylcholine
receptors
Nature 263, 329 - 331

13. Berman P.W., Patrick J., Heinemann S., Klier F.G. & Steinbach J.H.
(1981)
Factors affecting the susceptibility of different strains of mice to
experimental myasthenia gravis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 377, 237 - 257

14. Christadoss P., Lindstrom J.M. Tálal N., Duvic C.R., Kalantri A.
& Shenoy M. (1986)
Immune response gene control of lymphocyte proliferation produced
by acetylcholine receptor specific helper factor derived from
lymphocytes of myasthenic mice
J. Immunol. 137, 1845 - 1849

15. Berman P.W. & Lindstrom J. (1980)
Experimental myasthenia gravis: a murine system
J. Exp. Med. 151, 204 - 223

16. Christadoss P., Lennon V.A. & David C. (1979)
Genetic control of experimental autoimmune myasthenia gravis
in mice. I. Lymphocyte proliferative response to acetylcholine
receptors is under H-2-linked Ir gene control
J. Immunol. 123, 2540 - 2543

17. Tarrab-Hazdai R., Aharonov A., Silman I. & Fuchs S. (1975)
Experimental autoimmune myasthenia induced in monkeys by
purified acetylcholine receptor
Nature 256, 128 - 130

18. Lindstrom J. (1977)
An assay of antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis
Clinical Immunology and Immunopathology 7, 36 - 43
19. Monnier V.M. & Pulpis B.W. (1977)
A radioimmunoassay for the quantitative evaluation of anti human acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis
Clin Exp. Immunol. 29, 16 - 22
20. Lefvert A.K., Bergström G., Matell G., Ostermann P.O. & Pirskanen R. (1978)
Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: Clinical usefulness and pathogenic implications
J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 41, 394 - 403
21. Lindstrom J. (1984)
Nicotinic acetylcholine receptors: Use of monoclonal antibodies to study synthesis, structure and function and autoimmune response in: Monoclonal anti-idiotypic antibodies. Probes for receptor structure and function, 21- 57
ed. Alan R. Liss, New York
22. Engel A.G. (1984)
Myasthenia gravis and myasthenic syndromes
Annals of Neurology 16, 519 - 534
23. Fambrough D., Drachman D.B. & Satyamurti S. (1973)
Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors
Science 182, 293 - 295
24. Biologie (1976)
Springer Verlag Berlin
25. Jablecki C. (1984)
Lambert Eaton myasthenic syndrome
Muscle and Nerve 7, 250 - 257
26. Kolb. H. & Toyka K (1983)
Autoimmune tissue damage: humoral or cellular effector mechanisms
Immunology Today 4, 392- 394

27. Lindstrom J.M., Seybold M.E., Lennon V.A., Whittingham S. & Duane D. (1976)
Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates and diagnostic value
Neurology 26, 1054
28. Vincent A. & Newsom-Davis J. (1985)
Acetylcholine receptor antibody as diagnostic test for myasthenia gravis: Results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 48, 1246 - 1252
29. Kalies I., Heinz F., Hohlfeld R., Wekerle H., Birnberger K.L. & Kalden J.R. (1984)
Physicochemical and immunochemical properties of acetylcholine receptors from human muscle
Molecular and Cellular Biochemistry 64, 69 - 79
30. McAdams M.W. & Roses A.D. (1980)
Comparison of antigenic sources for acetylcholine receptor antibody assays in myasthenia gravis
Annals of Neurology 8, 61 - 66
31. Tzartos S., Hochschwender S., Vasquez P. & Lindstrom J. (1987)
Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor
J. Neuroimmunol 15, 185 - 194
32. Richman D.P., Gomez C.M., Berman P.W., Burres S.A., Fitch F.W. & Arnson B.G.W. (1980)
Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia gravis
Nature 286, 738 - 739
33. Toyka K.V., Drachman D.B., Pestronk A. & Kao I. (1975)
Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse
Science 190, 397 - 399
34. Toyka K.V., Drachman D.B., Griffin D.E., Pestronk A., Winkelstein J.A., Fischbeck K.H. & Kao I. (1977)
Myasthenia gravis: Study of humoral immune mechanism by passive transfer to mice
N. Engl. J. Med. 296, 125 - 131

35. Bogen S. Mozes E. & Fuchs S. (1984)
Induction of acetylcholine receptor specific suppression: An in vitro model of antigen specific immunosuppression in myasthenia gravis
J. Exp. Med 159, 292 - 304

36. Pachner A.R. & Kantor F.S. (1984)
In vitro and in vivo actions of acetylcholine receptor educated suppressor T-cell lines in murine experimental autoimmune myasthenia gravis
Clin. Exp. Immunol 56, 659 - 668

37. Pachner A.P. (1987)
Experimental models of myasthenia gravis: Lessons in autoimmunity and progress toward better forms of treatment
The Yale Journal of Biology and Medicine 60, 169 - 177

38. Zhang Y., Tzartos S. & Wekerle H. (1987)
AChR specific B-T lymphocyte interactions: privileged presentation of AChR by anti alpha-chain specific hybridomas
in: Gesellschaft für Immunologie J.49, 349 - 350

39. Christadoss P. & Dauphinee M.J (1986)
Immunotherapy for myasthenia gravis: a murine model
J. Immunol. 136, 2437 - 2440

40. Vincent A. (1980)
Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis
Physiological Reviews 60, 757 - 824

41. Willcox N., Schluep M., Ritter A., Schuurmann H.J., Newsom-Davis & Christensson B. (1987)
Myasthenic and nonmyasthenic thymoma: an expansion for a minor cortical epithelial cell subset
American Journal of Pathology 127, 447 - 460

42. Papatestas A.E., Jenkins G., Kornfeld P., Eisenkraft J.B., Fagerstrom R.P., Jason-Pozner A.B. & Aufses A.H. (1987)
Effects of thymectomy in myasthenia gravis
Annals of Surgery 206, 79 - 88

43. Golub E.S. (1982)
Die Immunantwort
Einführung in die Immunologie
Springer Verlag

44. Hood L.E., Weissmann I.L. & Wood W.B. (1978)
Immunology
ed. Hall J.: The Benjamin / Cummings Publishing Company
45. Hohlfeld R., Toyka K.V., Besinger U.A., Gerhold B. & Heininger K. (1985)
Myasthenia gravis: Reaction of clinical disease and of autoimmune factors after discontinuation of long-term Azathioprine
Ann. Neurol. 17, 238 - 242
46. Wekerle H., Paterson B., Ketelsen U.P. & Feldman M. (1975)
Sriated muscle fibers differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum
Nature 256, 493 - 494
47. Kao I. & Drachman D.B. (1977)
Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors. Possible relation to myasthenia gravis
Science 195, 74 - 75
48. Wekerle H., Ketelsen U.P., Zurn A.D. & Fulpius B.W. (1978)
Intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis: transient expression of acetylcholine receptors on thymus derived muscle cells
Eur. J. Immunol. 8, 579 - 583
49. Wekerle H., Hohlfeld R., Ketelsen U.P., Kalden J.R. & Kalies I (1981)
Thymic myogenesis, T-lymphocytes and the pathogenesis of myasthenia gravis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 377, 455 - 476
51. Gilhus N.E., Aarli J.A. & Matre R. (1983)
Myasthenia gravis: the specificities of skeletal muscle and thymus antibodies
Acta. Neurol. Scand. 68, 328 - 336
52. Hohlfeld R. & Toyka K.V. (1985)
Strategies for the modulation of neuroimmunological disease at the level of autoreactive T-lymphocytes
J. Neuroimmunol. 9, 193 - 204
53. Hohlfeld R., Conti-Tronconi B., Kalies I., Bertrams J. & Toyka K.V. (1985)
Genetic restriction of autoreactive acetylcholine receptor specific T-lymphocytes in myasthenia gravis
J. Immunol. 135, 2393 - 2399

54. Hohlfield R. Toyka K.V., Heininger K., Grosse-Wilde H.
& Kalles I. (1984)
Autoimmune human T-lymphocytes specific for acetylcholine receptor
Nature 310, 244 - 246
55. Hohlfield R. Kalles I., Ernst M., Ketelsen U-P. & Wekerle H. (1982)
T-lymphocytes in experimental autoimmune myasthenia gravis. Isolation
of T-helper cell lines
J. Neurological Sciences 57, 265 - 280
56. Christianssen F.T., Pollack M.S., Garlepp M.J. & Dawkins R.L.
(1984)
Myasthenia gravis and HLA antigens in american blacks and other
races
Journal of Neuroimmunology 7, 121 - 149
57. Lee T.D., Zhao T.M., Bu U.J., Lu C.Z., O'Donnell M.
Sandier S.G. (1984)
Association of HLA-DR4 with myasthenia gravis in the Chinese
Tissue Antigens 23, 127 - 129
58. Hawkins B.R., Chan-Lui W., Choi E. & Ho A. (1984)
Strong association of HLA-BW46 with juvenile onset myasthenia
gravis in Hongkong Chinese
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry
47, 555 - 557
60. Atassi M.Z., Mulac-Jericevic B., Yokoi T. & Manshour T. (1987)
Localization of the functional sites on the alpha chain of acetyl-
cholin receptor
Federation Proceedings 46, 2583 - 2547
61. Engel W.K., Lichter A.S. & Dalakas M.C. (1981)
Splenic and total body irradiation treatment of myasthenia gravis
Ann. N.Y. Acad. Sci. 377, 744 - 744
62. Schirallanzoni A., Peluchetti D. Mantegazza R., Piacchino F. &
Cornelio F. (1984)
Myasthenia gravis: Prolonged treatment with steroids
Neurology 34, 170 - 174
63. Berrih S., Safar D., LeVasseur P., Gaud C. & Bach J.F. (1984)
The in vivo effects of corticosteroids on thymocytes subsets in
myasthenia gravis
J. Clinical Immunology 4, 92 - 97

64. Pascuzzi R.M., Coslett B.C. & Johns T.R. (1984)
Long term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report
of 116 patients
Ann. Neurol. 15, 291 - 298
65. Marcus S.N., Chadwick D. & Walker R. (1984)
D-Penicillamine-induced myasthenia gravis in primary biliary
cirrhosis
Gastroenterology 86, 166 - 168
66. Pfeifer B., Kemkes K., Lüth G. & Krämer G. (1984)
D-Penicillamine induzierte Myasthenie
Akt. Rheumatol 9, 96 - 97
67. Moore A.P., Williams A.C. & Hillenbrand P. (1984)
Penicillaminie induced myasthenia reactivated by gold
British Medical Journal 288, 192 - 193
68. Dau P.C. & Evanston I. (1984)
Respiratory failure in myasthenia gravis: use of plasmapheresis
Chest 85, 721 - 722
69. Richman D.R. (1985)
Treatment of myasthenia gravis
J. Neurol 232, 202 - 203
70. Killen J.A. & Lindstrom J. (1984)
Specific killing of lymphocytes that course experimental autoimmune
myasthenia gravis by ricin toxin acetylcholin receptor conjugates
J. Immunol. 133, 2549 - 2553
71. Hofmann U. & Trommer W.E. (1986)
Therapie von Autoimmunerkrankungen
Nachr. Chem. Techn, Lab. 34, 1160 - 1164
72. DeShambo R. & Krolick K. (1986)
Selective in vitro inhibition of an antibody response to purified
acetylcholine receptor by using anti-idiotypic antibodies coupled
to the A-chain of ricin
J. Immunol 147, 3135 - 3139
73. Jerne N.K (1973)
The Immune System
Sci. American

74. Burdette S. & Schwartz R.S. (1987)
Idiotypes and idiotypic networks
New England Journal of Experimental Medicine 317, 219 - 224
75. Souroujon MC., Pachner A.R. & Fuchs S. (1986)
The treatment of passively transferred experimental myasthenia gravis
with anti idiotypic antibodies
Neurology 36, 622- 625
76. Agius M.A. & Richman D.P. (1986)
Suppression of development of experimental autoimmune myasthenia
gravis with isogenic monoclonal anti-idiotypic antibody
J. Immunol 137, 2195 - 2198
77. Wassermann N.H.; Penn A.S., Freimuth P.I. Treptow N., Wentzel S.,
Cleveland W.L. & Erlanger B.F. (1982)
Anti-idiotypic route to anti acetylcholine receptor antibodies and
experimental myasthenia gravis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4810 - 4814
78. Cleveland W.L., Wassermann N.H., Sarangarajan R., Perin A.S.
& Erlanger B.F. (1983)
Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally
functioning auto-anti idiotypic mechanism
Nature 305, 56 - 57
79. Pachner A.P. & Kantor F.S (1985)
The anti-idiotypic response to neurotoxin induces a disorder of
neuromuscular transmission
Neurology 35 (Suppl 1), 154
80. Souan M-L. & Gelfard M. (1986)
Immunological similarities between an experimental autoimmune myasthenia
gravis model an human myasthenia gravis
Neuroscience Letters 68, 282 - 287
81. Souroujon M.C. Barchan D. & Fuchs S. (1985)
Analysis and modulation of the immune response of mice to
actylcholine receptor by anit-idiotypes
Immunolog. Letters 9, 331 - 336
82. Waldor M.K., Shiram S., McDevitt H. & Steinman L. (1983)
In vivo therapy with monoclonal anti-I-A antibody suppress immune
response to acetylcholine receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2713 - 2717

83. Barfeld D. & Fuchs S. (1978)
Specific immunosuppression of experimental autoimmune myasthenia
gravis by denatured acetylcholine receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4006 - 4010
84. Barfeld D. & Fuchs S. (1977)
Immunological characterization of an irreversibly denatured
acetylcholine receptor
FEBS-Letters 77, 214 - 218
85. Kubo T., Noda M., Takai T., Tanabe T., Kayano T., Shimizu S.,
Tanaka K., Takahashi H., Hirose T., Inayama S., Kikuno R., Miyata T.
& Numa S. (1985)
Primary structure of delta subunit precursor of calf muscle
acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence
Eur. J. Biochem. 149, 5 -13
86. Einarson B., Gullick W., Conti-Tronconi B., Ellisman M. & Lindstrom J.
(1982)
Subunit composition of bovine muscle acetylcholine receptor
Biochemistry 21, 5295 - 5302
87. Schalke B.G.G., Klinkert W.E.F., Wekerle H. & Dwyer D.S. (1985)
Enhanced activation of a T-cell line specific for acetylcholine
receptor (AChR) by using anti-AChR monoclonal antibodies plus
receptor
J. Immunol. 134, 3643 - 3648
88. Hohlfeld R., Toyka K.V., Tzartos S.J., Larson W. & Conti-Tronconi B.
(1987)
Human T-helper lymphocytes in myasthenia gravis recognize the nicotinic
alpha subunit
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5379 - 5383
89. Drachman D.B. (1987)
Present and future treatment of myasthenia gravis
New England Journal of Experimental Medicine 316, 743 - 745
90. Hohlfeld R., Kalies I., Kohleisen B., Heininger K., Conti-Tronconi B.,
& Toyka K.V. (1986)
Myasthenia gravis: Stimulation of anti-receptor autoantibodies by
autoreactive T-cell lines
Neurology 36, 618 - 621
91. Tzartos S.J. & Lindstrom J. (1980)
Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure:
Localization of the main immunogenic region and detection of
similarities between subunits
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 755 - 759

92. Tzartos S.J., Seybold M.E. & Lindstrom J. (1982)
Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 188 - 192
93. Tzartos S., Langeberg L., Hochschwender S. & Lindstrom J. (1985)
Demonstration of a main immunogenic region on acetylcholine receptor from human muscle using monoclonal antibodies to human receptor
FEBS-Letters 158, 116 - 118
94. Tzartos S.J., Sophianos D. & Efthimiadis (1985)
Role of the main immunogenic region of acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An Fab monoclonal antibody protects against antigenic modulation by human sera
J. Immunol. 134, 2349 - 2349
95. Barkas T., Mauron A., Roth B., Alliod C., Tzartos S.J
& Ballivet M. (1987)
Mapping the main immunogenic region and toxin binding sites of the nicotinic acetylcholine receptor
Science 235, 77 - 80
96. Gershoni J.M. (1987)
Expression of the alpha subunit binding sites of the nicotinic acetylcholine receptor by Escherichia coli transformants
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 4318 - 4321
97. Lindstrom J., Criado M., Lam H., Le Nguyen D., Luther M., Ralston S., Rivier J., Swanson L., Whiting P., Berg D., Jacob M., Smith M., Stoilberg J., Sargent P. & Sarin V. (1986)
Probing acetylcholine receptors with monoclonal antibodies
In: Structure and Function of the Nicotinic Acetylcholine Receptor (ed. Maelicke A.) NATO ASI Series, Series H
Cell Biology, Vol 3, 19 - 33
98. Kurosaki T., Fukuda K., Konno T., Mori Y., Tanaka K-I., Mishina M. & Numa S. (1987)
Functional properties of nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in various combinations
FEBS-Letters 214, 253 - 258
99. Drachman D.B., Adams R. N., Stanley E.F. & Pestronk A. (1980)
Mechanism of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis
J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 43, 601 - 610

100. Boulter J., Luyten W., Evans K., Mason P., Ballivet M., Goldman D., Stengelin S., Martin G., Heinemann S. & Patrick J. (1985)
Isolation of a clone coding for the alpha subunit of a mouse acetylcholine receptor
J. Neuroscience 5, 2545 - 2552
101. Isenberg K.E., Mudd J., Shak V. & Merlie J.B. (1986)
Nucleotide sequence of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit
Nucleic Acid Res. 14, 5111 - 5117
102. Boulter J., Evans K., Martind G., Mason P., Stengelin S., Goldmann D., Heinemann S. & Patrick J (1986)
Isolation of cDNA clones coding for the precursor of the gamma subunit of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor
J. Neurosci. Res. 16, 37 - 49
103. Lapolla R.J., Mayne K.M. & Davidson N. (1984)
Isolation and characterization of a cDNA clone for the complete protein coding region of the delta subunit of the mouse acetylcholine receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7970 - 7974
104. Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Tanabe T., Shimizu S., Kikuyotani S., Kayano T., Hirose T., Inayama S., & Numa S. (1983)
Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha subunit precursor deduced from cDNA sequences
Nature 305, 818 - 823
105. Shibahara S., Kubo T., Perski H.J., Takahashi H., Noda M & Numa S. (1985)
Cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding gamma subunit precursor of muscle acetylcholine receptor
Eur. J. Biochem. 146, 15 - 22
106. Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M. & Changeux J.P. (1983)
Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2067 - 2071
107. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T & Numa S. (1982)
Primary structure of alpha-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences
Nature 299, 793 - 797

108. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Hirose T., Asai M., Takashima H., Inayama S., Miyata T. & Numa S. (1983)
Primary structure of beta- and delta- subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences
Nature 301, 251 - 255

109. Ballivet M., Patrick H., Lee J. & Heinemann S. (1982)
Molecular cloning of cDNA coding for gamma subunit of Torpedo acetylcholine receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4466 - 4470

110. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikuyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T. & Numa S. (1983)
Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits
Nature 302, 528 - 532

111. Claudio T., Ballivet M., Patrick J. & Heinemann S. (1983)
Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor gamma subunit
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1111- 1115

112. Tanabe T., Noda M., Furutani Y., Takai T., Takahashi H., Tanaka K., Hirose T., Inayama S. & Numa S. (1984)
Primary structure of beta subunit precursor of calf muscle acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence
Eur. J. Biochem. 144, 11 - 17

113. Takai T., Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Notake M., Shimizu S., Kayano T., Tanabe T., Tanaka K., Hirose T., Inayama S. & Numa S. (1984)
Primary structure of gamma subunit precursor of calf muscle acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence
Eur. J. Biochem. 143, 109 - 115

114. Takai T., Noda M., Mishina M., Shimizu S., Furutani Y., Kayano T., Ikeda T., Kubo T., Takahashi H., Takahashi T., Kuno M. & Numa S. (1985)
Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle
Nature 315, 761 - 764

115. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M. & Numa S. (1984)
Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs
Nature 307, 604 - 608

116. Mishina M., Tobimatsu T., Imoto K., Tanaka K., Fujita Y., Fukuda K., Kurasaki M., Takahashi H., Morimoto Y., Hirose T., Inayama S., Takahashi T., Kuno M & Numa S. (1985)
Location of functional regions of acetylcholine alpha subunit by site directed mutagenesis
Nature 313, 364 - 369
117. Sakmann B., Methfessel C., Mishina M., Takahashi T., Takai T., Kurasaki M., Fukuda K. & Numa S. (1985)
Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel
Nature 318, 538 - 543
118. Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C. & Sakmann B. (1986)
Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor
Nature 321, 406 - 411
119. Imoto K., Methfessel C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T., Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y. & Numa S. (1986)
Location of delta subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel
Nature 324, 670 - 674
120. Dav P.C. Yano C.S. & Ettinger S.J. (1979)
Antibody to acetylcholine receptor in canine and human myasthenia gravis: differential cross reactivity with human and rabbit receptor
Neurology 29, 1065 - 1068
121. Knight J.G., Lalng P., Adams D.D., Bray J.J. & Ling N.R. (1986)
Autoantibodies to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Light chains
Neurology 36, 1531 - 1533
123. Kaufmann R. & Oger J. (1986)
Antibodies to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: comparison between human and fetal calf antigen
Ann. N. Y. Acad. Sci. 477, 413 - 414
124. Gotti C., Mantegazza R. & Clementi F. (1984)
New antigen for antibody detection in myasthenia gravis
Neurology 34, 374 - 377
125. Stephenson F.A., Harrison R. & Lunt G.G. (1981)
The isolation and characterization of the nicotinic acetylcholine receptor from human skeletal muscle
Eur. J. Biochem 115, 91- 97

126. Vernet-der Garabedian B., Morel E. & Bach J.F. (1986)
Heterogeneity of antibodies directed against the alpha bungarotoxin binding site on human acetylcholine receptor and serenity of myasthenia gravis
J. Neuroimmunology 12, 65 - 74
127. Turnbull G.M., Harrison R. & Lunt G.G (1985)
Nicotinic acetylcholine receptor from foetal human skeletal muscle
Int. J. Devel. Neurosciences 3, 123 - 134
128. Toyka K.V. & Heininger K. (1986)
Acetylcholine-Rezeptor-Antikörper in der Diagnostik in der Myasthenia gravis
Deutsche Medizinische Wochenschrift 111, 1435 - 1439
129. Kemp G., Morley B., Dwyer D. & Bradley R.J. (1980)
Purification and characterization of nicotinic acetylcholine receptors from muscle
Membrane Biochemistry 3, 229 - 257
130. Fuchs S., Neumann D. & Safran A. (1986)
What can we learn about the acetylcholine receptor from synthetic peptides
in: Structure and Function of the Nicotinic Acetylcholine Receptor (ed. Maelicke A.) NATO ASI Series, Series H Cell Biology, Vol 3, 49 - 59, Springer Verlag Berlin
131. Lindstrom J., Walker-Nave B. & Einarson B. (1979)
Immunological similarities between subunits of acetylcholine receptor from Torpedo, Electrophorus and mammalian muscle
Biochemistry 18, 4470 - 4480
132. Claudio T. (1987)
Stable expression of transfected Torpedo acetylcholine receptor alpha subunits in mouse fibroblast L cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5967 - 5971
133. Claudio T. (1986)
Establishing a system for the stable expression of Torpedo acetylcholine receptors
in: Structure and Function of the Nicotinic Acetylcholine Receptor (ed. Maelicke A.) NATO ASI Series, Series H Cell Biology, Vol 3, 431 - 435
134. Maelicke A. (1984)
Biochemische Aspekte der cholinergen Reizung
Angew. Chemie 96, 193 - 219

135. Maelicke A. (1987)
Structure and function of the acetylcholine receptor
In: Handbook of Experimental Pharmacology
ed. Boren G.V.H., Farah A., Herken H. & Welcch A.D.
Volume: The Cholinergic Synapse (ed. Whittacker V.P.
Springer Verlag)

136. Changeux J.P., Devillers-Thiery A. & Chemouilli P. (1984)
Acetylcholine receptor: an allosteric protein
Science 225, 1335 - 1345

137. Hucho F. (1987)
The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel
Eur. J. Biochem. 158, 211- 226

138. Nicotinic acetylcholine receptor: Structure and function (1986)
NATO ASI Series, Series H: Cell Biology, Vol 3
ed. Maelicke A.

139. Gotti C., Conti-Tronconi B.M. & Raftery M.A. (1982)
Mammalian muscle acetylcholine receptor purification and
characterization
Biochemistry 21, 3148 - 3154

140. Cuatrecasas P. & Anfinsen C.B. (1971)
Affinity chromatography
Annu. Rev. Biochem. 40, 259 - 278

141. Arthur G. H. (1964)
Pregnancy in the cow
in Wright's Veterinary Obstetrics 3 rd. ed 64 - 69,
Bailliere, Tindall & Cox, London

142. Gordon T.J. (1978)
Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonylfluoride in
buffers
Anal. Biochem. 86, 574 - 579

143. Klett R.P., Fulpius B.W., Cooper D., Smith M., Reich E. & Possani
Lourival D.P. (1973)
The acetylcholine receptor: I Purification and characterization of a
macromolecule isolated from *Electrophorus electricus*
J. Biol. Chem. 248, 6841 - 6853

144. Covarrubias M., Prinz H., Meyers H-W. & Maelicke A. (1986)
Equilibrium binding studies of cholinergic ligands to the
membrane bound acetylcholine receptor
J. Biol. Chem. 261, 14955 - 14961
145. Maelicke A., Fulpius B.W., Klett R.P. & Reich E. (1977)
Acetylcholine receptor: Response to drug binding
J. Biol. Chem. 252, 4811 - 4830
146. Lee C.Y (1972)
Chemistry and pharmacology of polypeptides toxins in snake venoms
Annu. Review of Pharmacology and Toxicology 12, 265 - 282
147. Doster W., Hess B., Watters D. & Maelicke A. (1980)
Translational diffusion coefficient and molecular weight
of the acetylcholine receptors from *Torpedo marmorata*
FEBS Letters 113, 312
148. Laemmli U.K. (1979)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4
Nature 227, 680 - 685
149. Morrisey J.H. (1981)
Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure
with enhanced uniform sensitivity
Anal. Biochem. 117, 307 - 310
150. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: Procedure and some applications
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 - 4354
151. Fels G. Plümer-Wilk R., Schreiber M. & Maelicke A. (1986)
A monoclonal antibody interfering with binding and response of the
acetylcholine receptor
J. Biol. Chem. 261, 15746 - 15754
152. Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L. & Tolbert N.E. (1978)
A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination
in membrane and lipoprotein samples
Anal. Biochem. 87, 206 - 210
153. Olsen R.W., Meunier J.C. & Changeux J.P. (1972)
Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from
Electrophorus electricus by affinity chromatography
FEBS-Letters 28, 96 - 100

154. Dolly J.O. & Barnard E.A. (1977)
Purification and characterization of an acetylcholine receptor from
mammalian skeletal muscle
Biochemistry 16, 5053 - 5060

155. Momoi M.Y. & Lennon V.A. (1982)
Purification and biochemical characterization of nicotinic
acetylcholine receptors of human muscle
J. Biol. Chem. 257, 12757 - 12764

156. Changeux J.P., Kasal M. & Lee C.Y. (1970)
Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor
protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1241 - 1247

157. Maelicke A., Fulpius B.W. & Reich E. (1977)
Biochemical aspects of neurotransmitter receptors
in: Handbook of Physiology Vol. 1, Chapter 14, 492 - 519

158. Lindstrom J., Binarson B. & Tzartos S. (1981)
Production and assay of antibodies to acetylcholine receptor
Methods in Enzymology 74, 432 - 460

159. Lukas R.J. (1986)
Interactions of anti nicotinic acetylcholine receptor antibodies
at alpha-Bungarotoxin binding sites across species and tissues
Molecular Brain Research 1, 119 - 125

160. Heidelberger M. & Kendall F.E. (1935)
A quantitative theory of the precipitin reaction. The reaction
between crystalline egg albumin and its homologous antibodies
J. Exp. Med. 62, 697

161. Rübsem H., Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E. & Hess G.P. (1978)
Characterization of the calcium binding sites of the purified
acetylcholine receptor and identification of the calcium binding
subunit
Biochemistry 17, 3818 - 3825

162. Karlsson E., Arnberg H. & Eaker D. (1971)
Isolation of the principal neurotoxins of two Naja naja subspecies
Eur. J. Biochem. 21, 1 - 16

163. Martin B.B., Chibbers A.B. & Maelicke A. (1983)
The sites of neurotoxicity in alpha-Cobratoxin
J. Biol.Chem. 258, 8714 - 8722

164. Rùchel R., Watters D. & Maelicke A. (1981)
Molecular forms and hydrodynamic properties of acetylcholine receptor from electric tissue
Eur. J. Biochem. 119, 215 - 233

165. Lo M.M.S., Barnard E.A., & Dolly J.O. (1982)
Size of acetylcholine receptors in the membrane. An improved version of the radiation inactivation method
Biochemistry 21, 2210 - 2217

167. Scatchard G. (1949)
The attraction of protein for small molecules and ions
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672

168. Receptor binding techniques (1980)
Society of Neuroscience
Cincinnati Ohio, November 8 - 9

169. Frost. A.A & Pearson R.G. (1964)
Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen
Verlag Chemie

170. Brookes J.P. & Hall Z.W. (1975)
Acetylcholine receptors in normal and denervated rat diaphragm muscle. I. Purification and interaction with 125-J-alpha-Bungarotoxin
Biochemistry 14, 2092 - 2099

171. Shorr R.G., Lyddiatt A., Lo M.M.S., Dolly J.O. & Barnard E.A. (1981)
Acetylcholine receptor from mammalian skeletal muscle: Oligomeric forms and their subunits
Eur. J. Biochem. 116, 143 - 155

172. Schrader W.T. (1975)
Methods for extraction and quantification of receptors
in: Methods in Enzymology 36, 187 - 211

173. Weiland G.W. & Molinoff P.B. (1981)
Quantitative analysis of drug receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties
Life Sciences 29, 313 - 330

174. Bylund D.B. (1980)
Analysis of receptor binding data
in: Short Course Syllabus - Receptor Binding Techniques
70 - 99, Society for Neuroscience, Cincinnati, Ohio

175. Maelicke A. & Reich E. (1976)
On the interaction between Cobra alpha-neurotoxin and the
acetylcholine receptor
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol 40, 231 - 235
176. Weber M. & Changeux J.P. (1974)
Binding of *Naja nigricollis* 3H-alpha-toxin to membrane fragments
from *Electrophorus* and *Torpedo* electric organs. 3. Effect of local
anaesthetics on the binding of the tritiated alpha neurotoxin
Mol.Pharmacol. 10, 35 - 40
177. Fels G., Wolff E.K. & Maelicke A. (1982)
Equilibrium binding of acetylcholine to the membrane bound
acetylcholine receptor
Eur. J. Biochem. 127, 31 - 38
178. Covarrubias M., Prinz H., & Maelicke A. (1984)
Ligand-specific transitions of the membrane bound acetylcholine
receptor
FEBS Letters 169, 229 - 233
179. Heidmann T. & Changeux J.P. (1978)
Structural and functional properties of the acetylcholine
receptor protein and its purified and membrane bound state
Ann. Rev. Biochem. 47, 317 - 357
180. Coombs SE. & Hess G.P. (1984)
Acetylcholine receptor: some methods developed to study a
membrane bound regulatory protein
in: Cell Membranes - Methods and Reviews 2, 295 - 364
181. Segel I.H (1968)
Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in
general biochemistry
2 nd Edition John Wiley & Sons Inc. New York
182. Scadding G.K., Calder L., Vincent A., Prior C., Wray D.
& Newsom-Davis J. (1986)
Anti-acetylcholine receptor antibodies induced in mice by syngenic
receptor without adjuvans
Immunol. 58, 151 - 155
183. Elfman L. (1984)
Immunisation with *Torpedo* acetylcholine receptor
Progress in Neurobiology 23, 39 - 62

184. Bray J.J. & Drachman D.B. (1982)
Binding affinities of anti-acetylcholine receptor autoantibodies
in myasthenia gravis
I. Immunol. 128, 105 - 110

185. Kalles I. (1981)
Isolierung und Charakterisierung von Acetylcholinrezeptoren und ihre
immunologische Anwendung bei der Myasthenia gravis
Doktorarbeit; Universität Hannover

186. Plümer-Wilk R. (1985)
Struktur und Funktion des nikotinischen Acetylcholinrezeptors.
Eine Untersuchung mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern
Doktorarbeit; Ruhr-Universität Bochum

187. Watters D., Maelicke A. (1983)
Organization of ligand binding sites at the acetylcholine receptor:
A study with monoclonal antibodies
Biochemistry 22, 1811 - 1819

188. Kurosaki T., Fukuda K., Konno T., Mori Y., Tanaka K., Mishina M.
& Numa S. (1987)
Functional properties of nicotinic acetylcholine receptor subunits
expressed in various combinations
FEBS-Letters 214, 253 - 258

189. Bennett J.P. (1978)
Methods in binding studies
In: Neurotransmitter receptor binding, 57 - 90
ed. Yamamura H.J. et al., Raven Press New York

190. Dolly J.O. & Barnard E.A. (1975)
Complete purification of the acetylcholine receptor protein from
mammalian muscle
FEBS Letters 57, 267 - 271

191. Shorr R.G., Dolly J.O. & Barnard E.A. (1975)
Composition of acetylcholine receptor protein from skeletal muscle
Nature 274, 283 - 284

192. Nathanson N.M. & Hall Z.W. (1979)
Subunit structure and peptide mapping of junctional and
extrajunctional acetylcholine receptors from rat muscle
Biochemistry 18, 3392 - 3401

Publikationsliste

- (1) G. Fels, R. Plümer-Wilk, M. Schreiber, A. Maelicke (1986)
A monoclonal antibody interfering with binding and response of the
acetylcholine receptor
The Journal of Biological Chemistry 261, 15746 - 15754
- (2) M. Schreiber, A. Maelicke (1986)
Myasthenia gravis induced by a mammalian acetylcholine receptor
(Poster)
NATO Advanced Research Workshop
Mechanism of Action of the Nicotinic Acetylcholine Receptor
May 19 - 23, 1986; Island of Santorini, Greece
- (3) A. Maelicke, G. Fels, R. Plümer-Wilk, M. Schreiber (1987)
Antibodies as probes of the structure and function of the
nicotinic acetylcholine receptor
Journal of Receptor Research
zur Publikation eingereicht

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Michael Schreiber
Geburtsdatum: 29. Januar 1956 in Frankfurt am Main
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

Ostern 1962 - Herbst 1967: Gemeinschaftsgrundschulen in Duisburg und Witten
1967 - 1974: Realschulen in Witten und Cappel
1974 - 1977: Sekundarstufe II am Albert-Martmöller-Gymnasium
in Witten
6. Juli 1977: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 1977 - Juli 1983: Studium der Biologie an der Ruhr-Universität
Bochum
13. Juli 1983: Diplom im Fach Biologie

Beruflicher Werdegang

15.08.1983 - 31.10.1983: Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Priv.
Dozent Dr. F. Falkenberg, Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der
Ruhr-Universität Bochum
1.11.1983 - 30.09.1987: Wissenschaftlicher Mitarbeit am Max-Planck-
Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund;
Promotion unter Anleitung von Herrn Prof. Dr.
A. Maelicke
seit 1.10.87: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeits-
gruppe von Herrn Prof. Dr. E. Petzinger am Max-
Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund

